

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



Avaliação do potencial antimicrobiano de óleos essenciais e nisina

Alina Kryshen

Mestrado em Microbiologia Aplicada

Dissertação orientada por:

Doutora Teresa Maria Leitão Semedo Lemsaddek

Professora Doutora Ana Maria Gonçalves Reis

2016



Avaliação do potencial antimicrobiano de óleos essenciais e nisina

Alina Kryshen

O trabalho apresentado nesta dissertação de mestrado foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa sob a orientação direta da Doutora Teresa Maria Leitão Semedo Lemsaddek no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. A Professora Doutora Ana Maria Gonçalves Reis foi a orientadora interna do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

2016

Agradecimentos

Gostaria de agradecer às pessoas que me ajudaram na realização da tese, já que sem a colaboração delas não o teria conseguido.

Em primeiro lugar, queria agradecer à Doutora Teresa Semedo Lemsaddek, que me orientou ao longo do meu trabalho, pela motivação e partilha do conhecimento, pela total disponibilidade, preocupação e muita paciência.

À Professora Doutora Ana Maria Gonçalves Reis, por me ter acompanhado ao longo do meu trabalho, pelas constantes palavras de força e de amizade.

Queria agradecer pelo acolhimento no Departamento de Produção Animal e Segurança Alimentar, Secção de Tecnologia dos Produtos Animais. Ao Professor Doutor António Salvador Barreto e à Professora Doutora Marília Ferreira pela constante ajuda e a força que me iam dando para continuar. À Zé e à Lena pelo carinho e ajuda que deram diariamente. As minhas colegas que estavam comigo no gabinete: à Mónica e à Vera. À minha menina checa Martina que apesar de ter estado durante sete meses tornou-se a minha amiga, que foi um grande apoio dando sempre força. E a todas pessoas espetaculares que eu fui conhecendo na Faculdade de Medicina Veterinária e que ficarão na minha memória para sempre.

Não posso esquecer agradecer a todos meus amigos que acompanharam nessa fase, pelo apoio, pelas palavras de motivação e momentos de descontração com muita alegria. Gostaria também agradecer ao Professor Luís Mendonça de Carvalho pelo apoio e pela motivação.

A minha fantástica família por nunca deixarem acreditar em mim, pelo muito amor, carinho e pela força para continuar. E ao meu remédio vivo de quatro patas: Sofi.

Muito obrigada a todos por fazerem parte da minha vida, sem vocês não seria a pessoa que sou hoje, e não chegaria onde cheguei.

Resumo

Os microrganismos deteriorativos e patogénicos de origem alimentar são ubíquos e continuam a ser uma importante causa de perdas económicas ao nível da produção e de doenças veiculadas por alimentos. Adicionalmente, o aumento crescente de microrganismos resistentes aos antibióticos e desinfetantes, associado à capacidade de formação de biofilmes, constitui um grave problema para a segurança alimentar e uma preocupação crescente na área da saúde pública.

O presente estudo teve como principal objetivo a avaliação da atividade antimicrobiana de dois óleos essenciais -OEs- (tomilho e erva-príncipe) e de uma bacteriocina (nisina) sobre microrganismos comumente presentes nos alimentos, nomeadamente *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* e *Brochothrix thermosphacta*. A ação antimicrobiana dos compostos em análise foi testada tendo como alvo células planctónicas e biofilmes (culturas puras e mistas), tendo sido estudados diferentes tempos de incubação, temperaturas e superfícies de contacto (poliestireno e aço inoxidável). Os compostos antimicrobianos foram utilizados puros ou em combinação, de forma a comprovar possíveis efeitos sinérgicos.

Analisando a ação antimicrobiana dos OEs e nisina (tanto individualmente como em combinação) sobre culturas puras e mistas de microrganismos, o OE_{tomilho} demonstrou possuir uma atividade antimicrobiana superior, sendo necessárias menores concentrações deste OE para que ocorra inibição do crescimento microbiano. Quanto ao OE_{erva-príncipe} e nisina, embora também possuam potencial antimicrobiano, são necessárias concentrações mais elevadas para que haja um efeito eficaz. No que diz respeito à ação sinérgica dos compostos antimicrobianos, esta foi demonstrada apenas para algumas das combinações em análise.

Quanto à capacidade de erradicação de biofilme, constatou-se que os dois OEs em estudo foram eficazes sobre todas as culturas puras testadas, com uma única exceção (OE_{erva-príncipe} foi incapaz de erradicar o biofilme formado por um dos isolados da espécie *E. faecalis* em análise). Relativamente à capacidade de erradicação do biofilme formado por culturas mistas, os compostos em análise foram eficazes apenas em metade das situações testadas.

Em conclusão, após avaliação da possível aplicabilidade de OEs e nisina como agentes antimicrobianos contra microrganismos patogénicos e deteriorativos presentes nos alimentos, considera-se que estes compostos naturais podem constituir uma importante mais-valia para o desenvolvimento de novas estratégias preventivas a implementar na indústria alimentar.

Palavras-chaves: Segurança alimentar; microrganismos patogénicos e deteriorativos; atividade antimicrobiana; óleos essenciais; nisina.

Abstract

Deteriorative and pathogenic foodborne microorganisms are ubiquitous and continue to be a major cause of economic losses in terms of food production and foodborne illnesses. Moreover, the increasing number of microorganisms resistant to antibiotics and disinfectants, associated with biofilm formation capacity, constitute a serious problem for food safety and a growing concern regarding public health.

This study's main objective was to evaluate the antimicrobial activity of two essential oils - EOs- (thyme and lemongrass) and a bacteriocin (nisin) against microorganisms commonly present in food, including *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, and *Brochothrix thermosphacta*. The antimicrobial action of the compounds was tested against planktonic cells and biofilms (both pure and mixed cultures) using different incubation periods, temperatures and contact surfaces (polystyrene and stainless steel). The antimicrobial compounds were used individually or in combination, in order to establish possible synergistic effects.

Analyzing the antimicrobial activities of nisin and EOs (both individually or in combination) on pure and mixed cultures of microorganisms, EO_{thyme} showed a superior antimicrobial activity, requiring lower concentrations of EO in order to inhibit microbial growth. As for the EO_{lemongrass} and nisin, although both possess antimicrobial potential, higher concentrations are needed to achieve successful inhibition. Regarding the synergistic action of antimicrobial compounds, it could only be demonstrated for some of the combinations analyzed.

Regarding the ability to eradicate biofilms, it was found that the two EOs were effective on all tested pure cultures, with one exception (EO_{lemongrass} was unable to eradicate the biofilm formed by one of the *E. faecalis* analyzed). Considering the ability to eradicate biofilms formed by mixed cultures, the tested compounds were effective only in half of the cases tested.

In conclusion, after evaluation of the putative applicability of EOs and nisin as antimicrobial agents against pathogenic and deteriorative microorganisms present in food, these natural compounds can be considered an important asset for the development of new preventive strategies to be implemented in the food industry.

Keywords: Food safety; pathogenic and deteriorative microorganisms; antimicrobial activity; essential oils; nisin.

Índice

1.	Introdução.....	1
1.1	Doenças de origem alimentar	1
1.1.1	Microrganismos patogénicos presentes nos alimentos.....	2
1.1.1.1	<i>Aeromonas</i> spp.	2
1.1.1.2	<i>Enterococcus</i> spp.....	3
1.1.1.3	<i>Listeria</i> spp.	4
1.1.2	Agentes deteriorativos presentes nos alimentos	5
1.1.2.1	<i>Brochothrix</i> spp.	5
1.2	Biofilmes	6
1.2.1	Definição e formação de biofilmes.....	6
1.2.2	Biofilmes na indústria alimentar	7
1.3	Compostos naturais com atividade antimicrobiana	8
1.3.1	Óleos essenciais.....	8
1.3.1.1	<i>Thymus vulgaris</i>	10
1.3.1.2	<i>Cymbopogon flexuosus</i>	11
1.3.2	Bacteriocinas	12
1.4	Objetivos do trabalho	13
2	Materiais e Métodos	14
2.1	Microrganismos em estudo e manutenção das culturas.....	14
2.2	Curvas de crescimento a diferentes temperaturas.....	15
2.3	Avaliação da capacidade de formação de biofilme	16
2.3.1	Formação de biofilme em microplacas de poliestireno com tampa em espigão	16
2.3.2	Formação de biofilme em discos de aço inoxidável.....	18
2.4	Agentes antimicrobianos: Óleos essenciais e nisina.....	19
2.4.1	Método da difusão em meio sólido: <i>screening</i> inicial	20
2.4.2	Método da microdiluição: Determinação das concentrações mínimas inibitórias, bactericidas e ação sinérgica de compostos antimicrobianos	20
2.4.3	Determinação da ação de óleos essenciais na erradicação de biofilmes	23
2.5	Análise de dados.....	25
3.	Resultados e Discussão	26
3.1	Curvas de crescimento a diferentes temperaturas.....	26
3.2	Avaliação da capacidade de formação de biofilme	29
3.3	Avaliação da ação antimicrobiana e sinérgica de óleos essenciais e nisina sobre células planctónicas.....	32
3.4	Avaliação da ação antimicrobiana de óleos essenciais na erradicação de biofilmes.....	40
4.	Conclusões	43
5.	Referências bibliográficas	45

Índice de Figuras

Figura 1.1.	Formação de biofilme.....	7
Figura 1.2.	Constituição da parede celular de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas.....	9
Figura 1.3.	<i>Thymus vulgaris</i>	11
Figura 1.4.	<i>Cymbopogon flexuosus</i>	11
Figura 2.1.	Esquema representativo das microplacas utilizadas para o estudo das curvas de crescimento a diferentes temperaturas (4, 12, 20, 25 e 37°C).....	15
Figura 2.2.	Esquema representativo da tampa em espigão. O biofilme encontra-se representado pelos círculos verdes à volta do espigão.....	16
Figura 2.3.	Esquema representativo da microplaca utilizada para avaliação da capacidade de formação de biofilme (culturas puras).....	16
Figura 2.4.	Combinações bacterianas analisadas.....	17
Figura 2.5.	Esquema representativo da microplaca utilizada para avaliação da capacidade de formação de biofilme (combinações bacterianas).....	18
Figura 2.6.	Esquema representativo da microplaca com discos de aço inoxidável.....	18
Figura 2.7.	Esquema representativo da placa com discos de aço inoxidável (combinações bacterianas).....	19
Figura 2.8.	Esquema representativo de duas microplacas utilizadas na determinação das concentrações mínimas inibitórias e concentrações mínimas bactericidas para as culturas puras.....	21
Figura 2.9.	Esquema representativo da microplaca utilizada na determinação das concentrações mínimas inibitórias e concentrações mínimas bactericidas para culturas mistas	22
Figura 2.10.	Combinações de compostos antimicrobianos em análise	22
Figura 2.11.	Esquema representativo da microplaca com formação de biofilme na tampa em espigão (culturas puras).....	23
Figura 2.12.	Esquema representativo da microplaca de erradicação de biofilme.....	24
Figura 2.13.	Esquema representativo da microplaca com formação de biofilme em tampa em espigão (combinações bacterianas).....	25
Figura 3.1.	Curvas de crescimento microbiano nas cinco temperaturas distintas. Para cada temperatura estão representados seis microrganismos. O eixo das abcissas indica o tempo (horas) e o eixo das ordenadas o \ln_{DO600} . As curvas de crescimento representam a média de seis réplicas.....	27

Figura 3.2.	Capacidade de formação de biofilme a 4 e 25°C (culturas puras). L1 – <i>L. monocytogenes</i> CECT 937; L2 – <i>L. monocytogenes</i> CECT 935; E1 – <i>E. faecalis</i> QSE123; E2 – <i>E. faecalis</i> V583; A1 – <i>A. hydrophila</i> A259; B1 – <i>B. thermosphacta</i> ATCC 11509 ^T . O ensaio decorreu em duas superfícies distintas (poliestireno e aço inoxidável), durante 12 dias a 4°C. As barras representam as médias das quatro réplicas, com os respetivos desvios padrão.....	29
Figura 3.3.	Capacidade de formação de biofilme a 4 e 25°C (culturas mistas). L1 – <i>L. monocytogenes</i> CECT 937; L2 – <i>L. monocytogenes</i> CECT 935; E1 – <i>E. faecalis</i> QSE123; E2 – <i>E. faecalis</i> V583; A1 – <i>A. hydrophila</i> A259; B1 – <i>B. thermosphacta</i> ATCC 11509 ^T . O ensaio decorreu em duas superfícies distintas (poliestireno e aço inoxidável), durante 12 dias a 4°C. As barras representam as médias das quatro réplicas, com os respetivos desvios padrão.....	30

Índice de Tabelas

Tabela 1.1.	Agentes etiológicos de doenças veiculadas por alimentos e possíveis fontes.....	1
Tabela 1.2.	Agentes etiológicos, fontes alimentares e número de casos confirmados.....	2
Tabela 2.1.	Microrganismos em estudo.....	14
Tabela 2.2.	Óleos essenciais utilizados neste estudo.....	19
Tabela 3.1.	Taxas específicas de crescimento a diferentes temperaturas.....	28
Tabela 3.2.	Atividade antimicrobiana dos compostos pelo método da difusão em meio sólido.....	33
Tabela 3.3.	Concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida dos compostos antimicrobianos para microrganismos testados (culturas puras).....	33
Tabela 3.4.	Concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida dos compostos para combinações microbianas (culturas mistas).....	35
Tabela 3.5.	Determinação do efeito sinérgico entre compostos antimicrobianos.....	38
Tabela 3.6.	Concentrações mínimas de erradicação de biofilme dos OEs sobre os microrganismos em estudo (cultura pura).....	40
Tabela 3.7.	Concentrações mínimas de erradicação de biofilme para os OEs (culturas mistas).....	41

Lista de abreviaturas

A1- *Aeromonas hydrophila* A259
ATCC - *American Type Culture Collection*
B1 - *Brochothrix thermosphacta* ATCC 11509
BAL - Bactérias Ácido Lácticas
BHI - *Brain Heart Infusion*
CECT - Colección Española de Cultivos Tipo
CIF- Concentração Inibitória Fracionada
CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*
CMB - Concentração Mínima Bactericida
CMEB - Concentração Mínima de Erradicação de Biofilme
CMI - Concentração Mínima Inibitória
DAN - Departamento de Alimentação e Nutrição
DGS - Direção Geral da Saúde
DNA -Ácido desoxirribonucleico
DO - Densidade óptica
DO₆₀₀ - Densidade óptica a 600 nanómetros
E1 - *Enterococcus faecalis* QSE123
E2 - *Enterococcus faecalis* V583
EFSA - *European Food Safety Authority*
EPS - *Extracellular Polymeric Substance*
IACS – Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde
ICIF - Índice da Concentração Inibitória Fracionada
INSA - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
L1 - *Listeria monocytogenes* CECT 937
L2 - *Listeria monocytogenes* CECT 935
LPS - Lipopolissacáridos
NaCl - Cloreto de sódio
OE - Óleo Essencial
OE_{erva-príncipe} - Óleo Essencial de erva-príncipe
OE_{tomilho} - Óleo Essencial de tomilho
OMS - Organização Mundial de Saúde
pH - Potencial hidrogeniónico
^T - Estirpe-tipo (type strain)
UA – Unidade de Absorvância
UFC - Unidades Formadoras de Colónias
UI - Unidade Internacional
v/v - Volume por volume
μ - Taxa específica de crescimento

1. Introdução

1.1 Doenças de origem alimentar

As doenças infecciosas de origem alimentar, designadas também por toxinfecções alimentares, constituem um dos maiores problemas para a segurança alimentar e saúde pública, tanto em países desenvolvidos como em vias de desenvolvimento (Santos e Cunha, 2007). A Organização Mundial de Saúde (OMS) define as doenças transmitidas pelos alimentos como “qualquer doença de natureza infecciosa ou tóxica que seja causada pelo consumo de alimentos ou água” (Adams e Moss, 2008). Estas patologias estão associadas a um conjunto de sintomas como náuseas, vómitos, diarreia e dores abdominais, sendo vulgarmente conhecidas como gastroenterites ou doenças diarreicas (Soares, 2007).

As doenças veiculadas por alimentos têm duas formas clínicas: toxinfecções e intoxicações. A toxinfecção está sempre associada à ingestão de alimentos contendo microrganismos, como por exemplo, espécies de *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria* ou *Bacillus cereus*. A intoxicação ocorre devido à presença de toxinas no alimento, mesmo que o microrganismo que lhe deu origem já não esteja presente no mesmo. Desta última, são exemplos as infeções mediadas por toxinas como por exemplo, de *Clostridium perfringens* ou de *Vibrio cholerae*, a neurotoxina de *Clostridium botulinum*, a enterotoxina de *Staphylococcus*, ou micotoxinas como a aflatoxina de *Aspergillus* (Viegas, 2014). Na Tabela 1.1 estão representados alguns microrganismos patogénicos e os alimentos a que podem estar associados (Adams e Moss, 2008).

Tabela 1.1. Agentes etiológicos de doenças veiculadas por alimentos e possíveis fontes.

Microrganismos	Alimentos
<i>Bacillus cereus</i>	Produtos cárneos, sopas, arroz cozinhado, massas, vegetais, enchidos, leite e produtos de pastelaria, produtos lácteos
<i>Clostridium perfringens</i>	Carnes cozidas, estufadas e assadas
<i>Escherichia coli</i>	Carne mal cozida, leite cru e produtos lácteos, legumes, saladas, sushi
<i>Listeria monocytogenes</i>	Leite cru e pasteurizado e produtos lácteos, carnes de diferentes animais, vegetais crus, salsichas de peru
<i>Salmonella</i>	Carne crua de animais infetados (especialmente aves), ovos, leite cru, frutos, ervas aromáticas e especiarias
<i>Shigella</i>	Saladas, mariscos, águas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Carnes e produtos cárneos processados, carne de aves e ovos, leite e produtos lácteos, saladas, produtos de pastelaria (particularmente com creme)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Leite e produtos lácteos, carnes principalmente de porco, peixe, mariscos, frutos e vegetais

Adaptado de Adams e Moss, 2008 e Jay *et al.*, 2005

Em Portugal, o Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) em colaboração com outros departamentos do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), organizaram um estudo com o objetivo de compilar, analisar e interpretar dados e surtos de toxinfecções alimentares ocorridos no nosso país. Este estudo incluiu os surtos com agente causal identificado, que ocorreram nos últimos seis anos. No total, o INSA registou 53 surtos com o agente identificado, que provocaram mais de 1274 casos de toxinfecções alimentares e 145 hospitalizações.

Relativamente ao ano 2014, foi realizada a investigação de 25 surtos que afetaram um total de 836 indivíduos. No entanto, neste ano o agente etiológico foi identificado em apenas 13 destes surtos, sete em amostras clínicas e seis em géneros alimentícios (http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/3007/3/observacoesNEspecia5-2015_artigo1.pdf, data de consulta 09/09/2016).

Na Tabela 1.2, estão representados os dados referentes aos seis surtos de origem alimentar confirmados, com os respetivos alimentos (correspondendo a refeições servidas frias e quentes).

Tabela 1.2. Agentes etiológicos, fontes alimentares e número de casos confirmados.

Agente etiológico	Alimentos	Nº de casos
Enterotoxina diarreica de <i>Bacillus cereus</i>	Torta de pescada	34
<i>Bacillus cereus</i> produtor de enterotoxina diarreica + Estafilococos produtor de enterotoxina estafilocócica tipo C	Polvo à lagareiro	9
<i>Bacillus cereus</i> produtor de enterotoxina diarreica + <i>Clostridium perfringens</i>	Salada de feijão-frade com atum, cebola, salsa, ovo cozido e delícias do mar	14
Enterotoxina estafilocócica tipo A	Salada fria de massinhas com frango desfiado	41
Enterotoxina estafilocócica	Salada fria de frango desfiado e legumes cozidos	65
<i>Clostridium perfringens</i>	Feijoada de javali	30

Adaptado de Viegas *et al.*, 2014 (http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/3007/3/observacoesNEspecia5-2015_artigo1.pdf, data de consulta 9/09/2016).

Neste contexto, é obrigação dos operadores do setor alimentar assegurar que em todas as fases da produção, transformação e comercialização de géneros alimentícios haja segurança dos produtos alimentares (Soares, 2007). Assim, o controlo da qualidade microbiológica em toda a cadeia alimentar, desde a produção até ao consumo, tem elevada relevância, sendo importante a implementação de sistemas de segurança alimentar eficazes para que sejam cumpridas as boas práticas de higiene e manipulação de alimentos (Novais, 2006).

Muitos dos microrganismos responsáveis por toxinfecções alimentares têm a capacidade de colonizar o ambiente por longos períodos sob a forma de biofilme em superfícies de equipamentos e utensílios, utilizados no armazenamento ou processamento de alimentos. As estratégias de controlo microbiano têm-se mostrado pouco eficazes na erradicação completa dos microrganismos perigosos sem que a qualidade do produto seja afetada, havendo, por isso, uma grande necessidade de métodos alternativos (como os compostos naturais de origem vegetal ou microbiana) para a sua eliminação (Srey *et al.*, 2013).

1.1.1 Microrganismos patogénicos presentes nos alimentos

Os microrganismos patogénicos de origem alimentar são ubíquos e continuam a ser uma importante causa de problemas de saúde pública. No entanto, antes de iniciar uma estratégia de prevenção, é necessário conhecer as principais características dos microrganismos problemáticos, visto que o controlo destes permitirá evitar possíveis contaminações dos produtos alimentares durante o seu processamento e armazenamento.

1.1.1.1 *Aeromonas* spp.

O género *Aeromonas* descrito no Manual Bergey de Bacteriologia, pertence à família *Aeromonadaceae*, ordem *Aeromonadales*, classe *Delta Proteobacteria* e filo *Proteobacteria* (Tavares *et al.*, 2014). Atualmente, são reconhecidas 35 espécies e 12 subespécies [<http://www.bacterio.net/aeromonas.html>, data de consulta 06/12/2016].

As bactérias pertencentes ao género *Aeromonas* são Gram-negativas em forma de bastonete, anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos, catalase e oxidase positivas, móveis por um único flagelo polar, tendo, algumas espécies, por vezes, flagelos laterais. A temperatura de crescimento varia

entre 0 e 45°C, sendo que o seu crescimento ótimo se situa entre os 22 e 37°C (Adams e Moss, 2008; Igbinosa *et al.*, 2012). São microrganismos ubíquos, podendo ser isolados numa grande diversidade de ambientes aquáticos. Atualmente, estão também associados a uma grande variedade de infeções intestinais e extraintestinais em humanos e animais (Igbinosa *et al.*, 2012). Em Espanha, os microrganismos do género *Aeromonas* spp. ocuparam o quarto lugar entre os agentes etiológicos responsáveis por doenças gastrointestinais durante o período de 1997 a 2006 (Pablos *et al.*, 2011).

De acordo com Adams e Moss (2008) *Aeromonas*, principalmente *Aeromonas hydrophila*, tem, presentemente, o estatuto de microrganismo patogénico emergente associado a infeções em seres humanos. Além disso, esta espécie encontra-se amplamente distribuída em ambientes aquáticos (considerado como o seu reservatório principal), afetando os animais de sangue frio como anfíbios, peixes e répteis (Daskalov, 2006). A colonização do trato gastrointestinal humano por *A. hydrophila* ocorre, normalmente, através da ingestão de água ou comida contaminada (Daskalov, 2006). Mizan *et al.* (2015) observaram que *A. hydrophila* tem sido isolada em produtos provenientes do mar, como mariscos e peixes, bem como águas residuais e água doce. Para além disso, devido à capacidade de crescer a temperaturas de refrigeração, *A. hydrophila* tem sido detetada em alimentos armazenados provenientes das indústrias alimentares (Daskalov, 2006; Igbinosa *et al.*, 2012).

Em 2010, Aberoum e Jooyandeh sugeriram que as instalações onde os produtos provenientes do mar são processados também constituem uma fonte de contaminação. Adicionalmente, alimentos como carnes frescas e congeladas, leites, água e vegetais crus apresentam igualmente risco de contaminação (Daskalov, 2006). Em 2012, foi relatado um surto de contaminação por *A. hydrophila* na província de Guizhou, na China, tendo provocado diarreia aguda em mais de 200 estudantes universitários. Provavelmente, o surto foi causado pela ingestão de saladas lavadas com água contaminada por *A. hydrophila*. Para evitar episódios semelhantes, Zhang *et al.*, 2012, recomendaram um reforço de controlo durante a manipulação dos alimentos que possa garantir que os tanques e sistemas de esgotos respeitam as normas de boas práticas sanitárias e que existe monitorização das fontes de água.

1.1.1.2 *Enterococcus* spp.

Ao longo de vários anos, a classificação e a nomenclatura deste género geraram bastante interesse e discussão (Franz *et al.*, 2011; Giraffa, 2002). Atualmente, o género *Enterococcus* pertence à família *Enterococcaceae*, ordem *Lactobacillales*, classe *Bacilli* e filo *Firmicutes*. No entanto, a sua identificação tem sido problemática. Até à data são reconhecidas 55 espécies e duas subespécies [<http://www.bacterio.net/enterococcus.html>, data de consulta 6/12/2016].

Enterococcus são bactérias Gram-positivas, anaeróbias facultativas, de forma ovoide, quimiorganotróficas, catalase e oxidase negativas. A maioria das espécies são resistentes e muito versáteis, sendo capazes de sobreviver em 6,5% de NaCl, a pH 9,6 e a uma ampla gama de temperaturas, que variam entre 10 e 45°C, situando-se o seu crescimento ótimo entre os 35 e 37°C (Moreno *et al.*, 2006; Ogier e Serror, 2008). O habitat predominante destes microrganismos é o trato gastrointestinal de seres humanos e animais (Franz *et al.*, 2011; Giraffa, 2000). Sendo microrganismos ubíquos podem ocupar diferentes nichos ecológicos associados a plantas, alimentos crus e fermentados, solos e águas superficiais, entre outros (Giraffa, 2002; Semedo *et al.*, 2003). Segundo Moreno *et al.* (2006) o género *Enterococcus* constitui o grupo mais controverso das bactérias ácido lácticas (BAL), pois, apesar do envolvimento destas bactérias no desenvolvimento de características organoléticas vantajosas em vários produtos alimentícios, o que é facto é que também estão envolvidas na degradação de produtos de origem alimentar. Neste momento, estão integrados no grupo dos

principais microrganismos responsáveis por Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde (IACS) (Franz *et al.*, 2011).

As espécies *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* são aquelas que estão predominantemente associadas à produção de alimentos fermentados (Franz *et al.*, 2011). No entanto, a espécie *E. faecalis* é também considerada responsável por cerca de 65% de todas as infecções por *Enterococcus* e a espécie *E. faecium* pela maioria das restantes (Prieto *et al.*, 2016). Atualmente, as infecções por *E. faecium* estão a aumentar em número, especialmente devido à existência de estirpes multirresistentes (Benbelaïd *et al.*, 2014).

Os elevados níveis de contaminação por *E. faecalis* são considerados a principal causa de deterioração de alguns produtos alimentícios, tais como produtos cárneos, queijos, vinho, sumos de fruta e produtos lácticos (Giraffa, 2002; Franz *et al.*, 2011). Lu *et al.* (2002) referiram a existência de um surto de sépsis por *E. faecium* em seres humanos e animais que ocorreu entre o mês de julho e setembro de 1998 ao longo do Rio Yangzi em Jiangshu, na China. O surto começou em suínos domésticos, com posterior disseminação pelas áreas adjacentes. Foram infetadas 40 pessoas, das quais 12 morreram. Em 2015, na região da Provença nos Alpes franceses Costa Azul em França, ocorreu um surto onde foi detetado o aumento das infecções do trato urinário na comunidade. Foi investigada a possível ligação entre isolados de *E. faecalis* isolados a partir de várias espécies de animais (aves domésticas, animais selvagens e domésticos). Concluíram que, embora *E. faecalis* tenha sido identificada em várias espécies animais, apenas um resultado permitiu identificar uma relação epidemiológica entre o isolado *E. faecalis* encontrado nas aves domésticas e o isolado *E. faecalis* responsável pelas infecções do trato urinário nos seres humanos (Abat *et al.*, 2016).

1.1.1.3 *Listeria* spp.

O género *Listeria* pertence à família *Listeriaceae*, ordem *Bacillales*, classe *Bacilli*, filo *Firmicutes* e, atualmente possui 19 espécies e seis subespécies [<http://www.bacterio.net/listeria.html>, data de consulta 06/12/2016]. Entre estas, *Listeria monocytogenes* é a espécie considerada maioritariamente responsável por infecções graves em seres humanos e animais e, estando *Listeria ivanovii* associada a infecções em ruminantes (Haubert *et al.*, 2015). Vários estudos taxonómicos envolvendo análises bioquímicas, de composição de DNA e de sequenciação do gene 16S rDNA, demonstraram que todas as espécies pertencentes a este género formam um grupo homogéneo relacionado com o género *Brochothrix*, justificando, assim, o enquadramento de ambos na mesma família (Norwak *et al.*, 2011)

As bactérias pertencentes ao género *Listeria* são Gram-positivas, em forma de bastonete, móveis, não-formadoras de esporos, anaeróbias facultativas e catalase e oxidase negativas. A sua temperatura de crescimento varia entre 0 e 45°C, com um crescimento ótimo entre os 35 e 37°C. Crescem numa vasta gama de valores de pH (4-9) e em concentrações de NaCl até 10% (Gandhi e Chikindas, 2007; Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

A espécie *L. monocytogenes* tem sido estudada devido à sua patogenicidade e ubiquidade, podendo ser isolada a partir do solo, vegetação, matéria fecal, esgotos, água e alimentos (Di Bonaventura *et al.*, 2008). A primeira cultura de *L. monocytogenes* foi registada em 1921 e isolada por Coton e Dumont, a partir de um paciente com meningite (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). É um microrganismo particularmente preocupante na indústria alimentar, demonstrando capacidade de crescer a temperaturas de refrigeração, suportando ambientes onde os alimentos são processados levando a alterações na qualidade destes (Magalhães *et al.*, 2016). Tem a capacidade de sobreviver em

vários alimentos, tais como queijos de pasta mole, laticínios, aves, suínos, peixe fumado, legumes e alimentos refrigerados prontos-a-consumir (Nyarko e Donnelly, 2015). Além disso, *L. monocytogenes* é responsável por vários casos de listeriose em humanos e animais, sendo normalmente transmitida pelo consumo de alimentos contaminados (Haubert *et al.*, 2015).

Listeriose é o nome dado à doença provocada por *L. monocytogenes* e trata-se de uma patologia com grande impacto na saúde pública, apresentando taxas de mortalidade e casos de hospitalização elevados (Gandhi e Chikindas, 2007). Em Portugal, a listeriose é uma doença de declaração obrigatória, no entanto os dados disponíveis são escassos. Em 2010, foram noticiadas, segundo a Direção Geral da Saúde (DGS), 13 mortes devido a listeriose, na região de Lisboa e vale do Tejo [<http://www.dn.pt/portugal/sul/interior/13-pessoas-mortas-com-listeriose1637454.html>, data de consulta 11/09/2016]. No entanto, a nível europeu, a listeriose tem aumentado nos últimos anos, estando confirmados 2161 casos em 2014 pela *European Food Safety Authority* (EFSA) [<https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/151217>, data de consulta 12/09/2016].

1.1.2 Agentes deteriorativos presentes nos alimentos

Na deterioração dos alimentos pode estar envolvida uma vasta gama de géneros microbianos, tais como *Pseudomonas*, *Alteromonas*, *Shewanella*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Clostridium* e *Brochothrix*. A deterioração dos alimentos pode justificar-se pelas propriedades físico-químicas dos próprios alimentos (fatores intrínsecos), pelas suas condições de armazenamento (fatores extrínsecos) ou pelo tipo de microrganismo presente, resultando em alterações de cor, odor, sabor, textura e aspeto do alimento (Gribble e Brightwell, 2013).

1.1.2.1 *Brochothrix* spp.

Entre os microrganismos deteriorativos, os membros do género *Brochothrix* têm sido particularmente estudados devido à sua presença em carnes de várias origens, tais como a carne bovina (Holley, 2014). Este género pertence à família *Listeriaceae*, ordem *Bacillales*, classe *Bacilos* e filo *Firmicutes*, embora o seu perfil bioquímico se aproxime mais da família *Lactobacillaceae*. Presentemente, são conhecidas apenas duas espécies, *Brochothrix campestris* e *Brochothrix thermosphacta* [<http://www.bacterio.net/brochothrix.html>, data de consulta 06/12/2016].

As bactérias pertencentes ao género *Brochothrix* são Gram-positivas em forma de bastonete, anaeróbias facultativas, não móveis, catalase positivas e oxidase negativa, capazes de tolerar concentrações elevadas de sal, pH baixo (5,5-6,5) e crescer na presença de concentrações elevadas de CO₂ (Gribble e Brightwell, 2013). A temperatura ótima de crescimento varia entre os 20 e 30°C, embora possam crescer a temperaturas de refrigeração, e há estipes pertencentes à espécie *B. thermosphacta* que têm a capacidade de crescer até 45°C (Nowak *et al.*, 2011).

Neste género, a espécie que tem sido alvo de maior interesse é *B. thermosphacta*, devido à capacidade de deterioração de carnes e produtos pré-embalados. O crescimento de *B. thermosphacta* em carnes embaladas a vácuo depende geralmente da quantidade de oxigénio disponível que permanece na embalagem (Gribble e Brightwell, 2013).

B. thermosphacta foi isolada pela primeira vez em 1951, a partir de salsichas de porco, e encontrada recentemente em carne bovina, borrego, peixe e carnes curadas (Gribble e Brightwell, 2013; Rattanasomboon *et al.*, 1999). Não é um microrganismo patogénico para o ser humano, mas é um microrganismo deteriorativo que facilmente cresce em instalações de processamento de carnes, ou

mesmo em carnes refrigeradas, tornando-se um contaminante economicamente muito importante nos produtos frescos e carnes processadas (Gribble e Brightwell, 2013; Holley *et al.*, 2014). Assim, de forma a diminuir os riscos da contaminação por este microrganismo e garantir uma boa qualidade do produto, é necessário um maior controlo durante os processos de produção de forma a limitar a sua distribuição e proliferação (Gribble e Brightwell, 2013; Nowak *et al.*, 2012).

1.2 Biofilmes

1.2.1 Definição e formação de biofilmes

Um biofilme pode ser definido como um sistema de estrutura organizada, onde as células microbianas aderem umas às outras numa superfície sólida (Ibrahim *et al.*, 2012). Estas células encontram-se envolvidas numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares (*Extracellular Polymeric Substance* - EPS), geralmente composta por DNA extracelular, proteínas e polissacáridos (Ibrahim *et al.*, 2012).

No seu habitat, a maioria dos microrganismos vive em comunidades de diferentes graus de complexidade, associadas a uma variedade de superfícies inertes (abióticas) e/ou vivas (bióticas), podendo formar biofilme composto por populações de uma única ou de múltiplas espécies (Shi e Zhu, 2009). A associação dos organismos em biofilmes constitui uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, favorecendo relações simbióticas e a sobrevivência em ambientes adversos, permitindo-lhes suportar a falta de nutrientes, mudanças de pH ou stresse oxidativo (Giaouris *et al.*, 2014; Jefferson 2004). Para além disso, as células sésseis são mais resistentes à ação de agentes antimicrobianos do que as células planctónicas (Giaouris *et al.*, 2014).

A formação de biofilmes é o resultado de processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem simultaneamente (O'Toole *et al.*, 2000; Kerekes *et al.*, 2015). O processo de formação de biofilmes caracteriza-se por cinco fases, representadas na Figura 1.1 (Kerekes *et al.*, 2015; Srey *et al.*, 2013; Stoodley *et al.*, 2002), nomeadamente:

1. **Adesão inicial (reversível)** – ocorre o contacto inicial entre a célula microbiana planctónica com uma superfície sólida e sua fixação. Nesta fase, o microrganismo pode ser removido. O processo inicial da adesão pode ser considerado passivo ou ativo. A adesão passiva é dirigida pela gravidade, difusão e dinâmica de fluidos. Na adesão ativa, as propriedades da superfície celular como flagelos, pili, cápsula e carga da superfície, facilitam a adesão. Essa adesão inicial à superfície dá-se através de interações fracas, tais como forças de Van der Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas;
2. **Adesão irreversível** – crescimento das células fixas através do fornecimento de nutrientes provenientes do líquido circundante, associado à produção e secreção de EPS. Nesta fase a remoção das células com métodos químicos e físicos é mais complexa;
3. **Crescimento do biofilme** – processo de agregação e crescimento de microrganismos, formação de microcolónias e canais de água com produção excessiva de EPS. Espécies bacterianas em sistemas naturais mostraram que a formação de microcolónias resultava do recrutamento de células planctónicas do meio envolvente, através da comunicação célula-a-célula (*quorum sensing*).

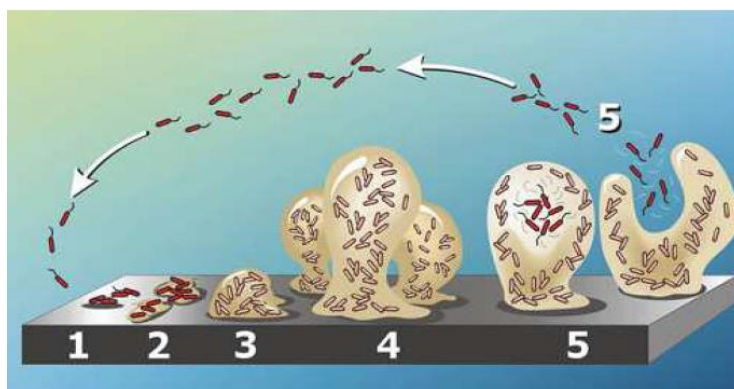


Figura 1.1. Formação de biofilme (extraída de Stoodley *et al.*, 2002)

4. **Maturação do biofilme** – é a etapa que consolida a estrutura organizada. A adesão de células microbianas planctônicas, entre outras partículas, contribui para a acumulação de biofilmes. A presença de poros e canais permite a passagem de nutrientes e água para as células do biofilme. Contudo, o tempo necessário para a maturação estrutural é muito variável, dependendo do(s) microrganismo(s) envolvido(s) e das condições ambientais;
5. **Dispersão** – é a última etapa do ciclo de formação de um biofilme, em que ocorre a libertação de porções de biomassa (células planctônicas ou microcolônias) que podem contaminar outras superfícies.

A formação de biofilme é um processo de desenvolvimento complexo, que pode ocorrer em diversas superfícies. Todavia, existem fatores que podem comprometer ou dificultar a sua formação (Shi e Zhu, 2009; Simões *et al.*, 2010; Srey *et al.*, 2013): (i) características do meio circundante; concentração e qualidade dos nutrientes; (ii) temperatura e pH; (iii) características dos microrganismos, como a presença de apêndices extracelulares, interações envolvidas na comunicação célula-célula e produção de EPS e (iv) tipo de material (nomeadamente, a composição e rugosidade), é um fator especialmente importante na formação do biofilme, pois quase todas as superfícies onde ocorre a deposição de microrganismos possuem irregularidades.

Os biofilmes podem ser formados por quase todos os tipos de microrganismos sob condições favoráveis. Vários são os estudos que descrevem a capacidade dos microrganismos patogênicos, de origem alimentar, que têm capacidade de fixar-se em diferentes superfícies de contacto com alimentos e formar biofilmes, como *L. monocytogenes*, *A. hydrophila*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* e *Bac. cereus* (Di Bonaventura *et al.*, 2008; Gavín *et al.*, 2002; Millezi *et al.*, 2013; Van Houdt e Michiels, 2010). Além dos microrganismos patogênicos, existem microrganismos deteriorativos que também são importantes nos biofilmes, tais como *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas fluorescens*, *B. thermosphacta*, *Moraxella* spp. e *Enterococcus* spp. (Benbelaïd *et al.*, 2014; Giarouris *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2010).

1.2.2 Biofilmes na indústria alimentar

Nas indústrias alimentares, a formação de biofilme microbiano, pode ocorrer à superfície de equipamentos e utensílios durante o processamento dos alimentos e causar graves problemas de saúde pública e a nível económico (Srey *et al.*, 2013). Existe uma diversidade de materiais que são usados na indústria alimentar, tais como aço inoxidável, borracha, poliestireno, polipropileno, nylon, vidro e madeira (Shi e Zhu., 2009; Srey *et al.*, 2013). Normalmente, os microrganismos aderem mais

facilmente a superfícies hidrofóbicas (plástico), do que hidrofílicas (metais e vidro) (Simões *et al.*, 2010). De entre as superfícies utilizadas nas indústrias, destaca-se o aço inoxidável, que é o material mais comumente utilizado nas superfícies de contacto com os alimentos, devido à sua estabilidade químico-física, resistência a diferentes temperaturas durante o processamento de alimentos, facilidade de limpeza e elevada resistência à corrosão (Van Houdt e Michiels, 2010).

Assim sendo, a capacidade das bactérias se fixarem a superfícies abióticas e formar biofilmes é um motivo de preocupação para muitas indústrias alimentares. As superfícies de contacto com alimentos são normalmente tratadas com agentes desinfetantes e produtos de limpeza que contêm cloro, peróxidos, iodóforo, hipocloritos, entre outros (Van Houdt e Michiels, 2010). No entanto, tem sido demonstrada uma fraca ação preventiva destes compostos e atualmente, as estratégias de controlo microbiano têm-se mostrado pouco eficazes em proporcionar uma erradicação completa, sem afetar a qualidade do produto (Srey *et al.*, 2013). Daí a necessidade de pesquisa de novos agentes antimicrobianos, que permitam um maior controlo do crescimento microbiano e consequente formação de biofilmes, de forma a evitar a deterioração e perda de qualidade do produto, e a consequente propagação de bactérias patogénicas (Van Houdt e Michiels, 2010).

1.3 Compostos naturais com atividade antimicrobiana

O uso exagerado de antibióticos, não só na medicina, mas também na indústria alimentar, pode levar a que os microrganismos se tornem resistentes ou até mesmo multirresistentes (Burt, 2004). É por isso necessário que se encontrem compostos naturais de origem vegetal ou microbiana com ação sobre microrganismos patogénicos e/ou deteriorativos, como também na tentativa de prevenir e/ou erradicar os biofilmes. Poderão contribuir assim para aumentar o tempo de vida útil dos alimentos e melhorar as condições de armazenamento visto que vão intervir no crescimento microbiano (Ahmad e Viljoen 2015; Gharsallaoui *et al.*, 2016; Seow *et al.*, 2014).

1.3.1 Óleos essenciais

As plantas são uma fonte inesgotável de produtos naturais, muitos deles metabolitos secundários, que o Homem utiliza nas mais diversas indústrias, nomeadamente na indústria alimentar, cosmética e perfumaria (Cunha *et al.*, 2012).

Os óleos essenciais (OEs) obtidos a partir de plantas aromáticas são misturas complexas de compostos naturais extremamente voláteis, com carácter hidrofóbico, caracterizados por possuírem odor forte (Burt, 2004). Estes metabolitos secundários são produzidos e armazenados nos órgãos secretores de plantas aromáticas, podendo ser encontrados em folhas, frutos, flores, gomos, sementes, ramos, cascas, raízes ou caules. A quantidade e composição dos OEs pode variar tanto a nível fisiológico, como também devido a fatores externos, como as condições de cultivo e colheita, condições pós-colheita e fatores ambientais, entre outros (Burt 2004; Cunha *et al.*, 2012; Mith *et al.*, 2014).

São conhecidos cerca de 3000 OEs, dos quais apenas 300 são considerados comercialmente importantes (Bhargava *et al.*, 2015). Geralmente são obtidos por destilação a vapor, prensagem a frio ou hidrodestilação e ao serem extraídos apresentam-se incolores ou ligeiramente amarelados (Mith *et al.*, 2014). Na natureza, os OEs têm como função proteger as plantas, no entanto a sua ação tem-se revelado importante na microbiologia, medicina e farmácia, pois são apontados como tendo um largo espetro de atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e anticancerígena (Bassolé e Juliani, 2012; Burt, 2004).

Os componentes maioritários, que normalmente determinam as propriedades biológicas dos OEs, são geralmente classificados em dois grupos. O grupo principal é constituído por terpenos e terpenóides, enquanto o segundo grupo inclui os compostos fenólicos com reduzida massa molecular (Hyldgaard *et al.*, 2012; Kerekes *et al.*, 2015). Os terpenos são hidrocarbonetos formados através da combinação de várias unidades de isopreno (C_5H_8), sendo os mais conhecidos o p-cimeno, o limoneno, o terpineno, o sabineno e o pineno. Terpenóides são terpenos modificados, com moléculas de oxigénio adicionadas ou em que os seus grupos metilo foram movidos ou removidos por enzimas específicas. Entre os terpenóides mais comuns podemos destacar o timol, o carvacrol, o linalol, o mentol, o geraniol, o acetato de linalila, o citronelal e a piperitona. Entre os compostos fenólicos os mais conhecidos são o eugenol, o isoeugenol, a vanilina, o safrol e o cinamaldeído (Kerekes *et al.*, 2015; Nazzaro, *et al.*, 2013). Em geral, OEs com atividade antimicrobiana elevada são ricos em compostos fenólicos tais como cinamaldeído, citral, carvacrol, eugenol e terpenóides como o timol (Bassolé e Juliani, 2012). No entanto, ao contrário do que é comumente aceite, a eficácia da atividade dos OEs não está exclusivamente ligada aos principais constituintes ativos, mas também a interações entre estes e os restantes componentes minoritários (Burt, 2004; Hyldgaard *et al.*, 2012).

Embora a atividade antimicrobiana dos OEs seja conhecida, o mecanismo de ação ainda não está completamente compreendido, pois depende da sua composição química, quantidades relativas dos componentes individuais e o microrganismo-alvo (Lambert *et al.*, 2001).

Geralmente, as bactérias Gram-negativas são mais resistentes à ação dos OEs do que as bactérias Gram-positivas, devido à diferente constituição da parede celular (Figura 1.2) (Nazzaro, *et al.*, 2013). Por exemplo, o timol e o carvacrol têm efeitos antimicrobianos semelhantes, mas diferentes mecanismos de ação sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Nazzaro, *et al.*, 2013).

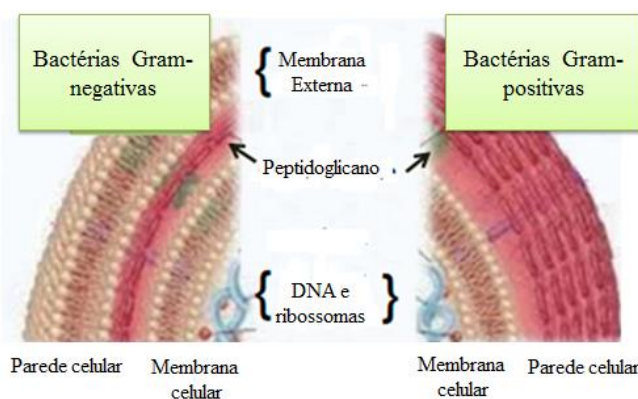


Figura 1.2. Constituição da parede celular de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas

Adaptado de Nazzaro, *et al.*, 2013

A parede celular das bactérias Gram-positivas é formada por peptidoglicanos aos quais estão ligados ácidos teicoicos e proteínas. A parede celular de bactérias Gram-negativas é mais complexa. Para além de parede celular apresenta uma membrana externa composta por lipopolissacarídeos (LPS), que lhe confere maior resistência aos OEs, pois dificulta a sua penetração e acumulação no interior da célula microbiana (Nazzaro, *et al.*, 2013). Tendo concentrações mais elevadas de OEs, ou outros agentes antimicrobianos naturais, a proteção fornecida pela parede celular não é capaz de evitar a penetração dos compostos e consequentemente morte celular. Outros autores sugerem ainda que os OEs podem danificar a membrana citoplasmática, destabilizando toda a sua estrutura e a correspondente homeostase celular. Como consequência, ocorre o aumento da permeabilidade celular, levando à fuga do conteúdo citoplasmático e morte celular (Burt, 2004; Nazzaro, *et al.*, 2013).

Os OEs têm ganho um grande interesse por parte do homem, não só na sua aplicação em produtos farmacêuticos, cosmética e aromaterapia, mas também nos alimentos como uma alternativa

de conservação natural. Atualmente uma vasta gama de conservantes são utilizados para prolongar a vida útil dos produtos alimentares. No entanto, a percepção do consumidor relativamente ao uso de aditivos alimentares sintéticos é cada vez mais negativa, tendo aumentado o interesse em encontrar alternativas naturais. Os OEs como os obtidos das plantas *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *C. citratus*, *Rosmarinus officinalis*, *Mentha longifoliae* ou *Citrus aurantifolia*, entre outros, têm demonstrado capacidade de interferir no desenvolvimento microbiano, nomeadamente sobre *Listeria innocua*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* ou *P. aeruginosa* (Burn, 2004; Hyldgaard *et al.*, 2012; Mith *et al.*, 2014). Assim, embora esteja demonstrado o potencial dos OEs e dos seus constituintes em ensaios realizados *in vitro*, continuam a existir limitações quando são aplicados *in vivo* (Bassolé e Juliani, 2012; Hyldgaard *et al.*, 2012): (i) por vezes são necessárias concentrações elevadas para inibir a atividade do microrganismo; (ii) a ação dos compostos dos OEs depende não só de fatores como o pH, a temperatura e o tipo de microrganismo, mas também da interação dos compostos antimicrobianos com os componentes presentes nos alimentos, tais como gordura, proteínas e amido; (iii) o odor forte característico dos OEs, pode comprometer o uso em alimentos devido às alterações organoléticas que provocam e além disso, a falta de conhecimento detalhando sobre o modo de ação de todos os constituintes dos OEs, poderá ser a causa subjacente para as limitações na sua utilização.

No caso das alterações organoléticas causadas por OEs, estas podem ser ultrapassadas utilizando algumas estratégias e precaução. A primeira opção é usar OEs inseridos na estrutura polimérica das próprias embalagens, de forma a proporcionar a libertação deste composto à superfície do alimento e não usar como um ingrediente no produto em si (Bhargava *et al.*, 2015). Outra opção seria a exploração do sinergismo entre OEs e outros conservantes de alimentos, de forma a maximizar a atividade dos compostos e minimizar a quantidade necessária para alcançar um efeito antimicrobiano específico (Burn, 2004; Hyldgaard *et al.*, 2012; Kerekes *et al.*, 2015). No entanto, o efeito sinérgico por ser comprometido pela existência dos fatores físicos e químicos do próprio produto, que poderão interferir na interação entre os componentes e nas suas atividades antimicrobianas, sendo necessário tê-los em consideração (Bassolé e Juliani, 2012).

Adicionalmente, os OEs e os seus componentes têm vindo a demonstrar ser capazes de combater a formação e o desenvolvimento de biofilmes (Benbelaïd *et al.*, 2014; Jafri *et al.*, 2014; Kavanaugh e Ribbeck, 2012; Kerekes *et al.*, 2015; Millezi *et al.*, 2013; Mohsenipour e Hassanshahian, 2015; Nostro *et al.*, 2007). O modo de ação de muitos OEs ou metabolitos secundários com interferência na formação, desenvolvimento e erradicação de biofilmes é ainda mal conhecida. No entanto, sabe-se que uma das formas de ação de alguns compostos é através da intervenção no *quorum sensing* das células, que se sabe ser um mecanismo importante na regulação da formação de biofilme bacteriano (Menoita *et al.*, 2012).

No presente trabalho foram analisados dois OEs, extraídos das plantas *Thymus vulgaris* e *Cymbopogon flexuosus*, que já demonstraram em estudos anteriores possuir atividade antimicrobiana (Ahmad *et al.*, 2014; Ahmad e Viljoen, 2015; Miladi *et al.*, 2013; Mohsenipour e Hassanshahian, 2015; Semwal *et al.*, 2014).

1.3.1.1 *Thymus vulgaris*

A espécie *Thymus vulgaris* é uma planta da família *Lamiaceae* amplamente distribuída pela Ásia, Europa do Sul e Norte da África; tendo o nome comum de tomilho (Figura 1.3.). O óleo essencial de tomilho (OE_{tomilho}) é obtido a partir das folhas da planta, por destilação a vapor (Ballester-Costa *et al.*, 2013). Apresenta atividade antimicrobiana, antiespasmódico, antioxidante, anti-inflamatório e antisséptico (Ahmad *et al.*, 2014; Cunha *et al.*, 2012). Além disso, está a ser

progressivamente utilizado em produtos de perfumaria, cosmética e aromaterapia (Ballester-Costa *et al.*, 2013).



Figura 1.3. *Thymus vulgaris*

Neste OE a atividade antimicrobiana deve-se principalmente a dois terpenóides, o timol e o carvacrol, com mecanismo de ação ao nível da membrana citoplasmática (Ahmad *et al.*, 2014; Ballester-Costa *et al.*, 2013). O OE_{tomilho} está na lista dos dez OEs mais usados como conservantes para fins alimentares (Ballester-Costa *et al.*, 2013). A sua ação antimicrobiana já foi demonstrada sobre *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *B. thermosphacta* entre outros (Jafri *et al.*, 2014; Norwak *et al.*, 2012; Perini *et al.*, 2014). Na indústria alimentar, o OE_{tomilho} é principalmente utilizado na indústria de carnes (Ballester-Costa *et al.*, 2013). Em 2002, Singh *et al.*, analisaram o efeito de várias concentrações do OE_{tomilho} (0,1, 1 e 10 mL/L) em alface e cenouras bebé, inoculados com *E. coli* O157:H7 com diferentes tempos de lavagem (1, 5, 10 e 15 min), tendo sido observada uma redução da população microbiana numa concentração de 1,0 mL/L durante 5 min.

1.3.1.2 *Cymbopogon flexuosus*

A espécie *Cymbopogon flexuosus* é uma planta da família *Poaceae* (Gramineae), sendo originária da Ásia e da Austrália, com o nome comum de erva-príncipe (Figura 1.4.). O óleo essencial de erva-príncipe (OE_{erva-príncipe}) é obtido através das folhas da planta, por destilação a vapor (Adinarayana *et al.*, 2012). O OE_{erva-príncipe} apresenta atividade anticancerígena, antimicrobiana, analgésica, anti-inflamatória e antiviral (Desai *et al.*, 2014). Além disso, é bastante utilizado na indústria da perfumaria, farmacêutica e aromaterapia (Adinarayana *et al.*, 2012).



Figura 1.4. *Cymbopogon flexuosus*

A atividade antimicrobiana deste OE deve-se principalmente a um composto fenólico, o citral, com mecanismo de ação ao nível da membrana citoplasmática (Oliveira *et al.*, 2010). Citral é o nome dado a uma mistura dos dois monoterpenos, o geranial e o neral (Desai *et al.*, 2014). A sua atividade antimicrobiana já foi demonstrada em *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Bac. subtilis* entre outros (Oliveira *et al.*, 2012; Adinarayana *et al.*, 2012). No entanto, o OE de *C. flexuosus* não é muito investigado, ao contrário do OE de espécie *C. citratus* que pertence ao mesmo género, apresentando composição química muito idêntica. Recentemente, Ortega-Ramirez *et al.* (2016) verificaram inibição

do crescimento por OE de *C. citratus in vitro* sobre *E. coli* (CMI = 2,210 g L⁻¹), *L. monocytogenes* (CMI = 1,33 g L⁻¹) e *S. aureus* (0,44 g L⁻¹) em vegetais como a alface e o espinafre. Moore-Neibel *et al.* (2012) também testaram a ação antimicrobiana do OE de *C. citratus* em vegetais, tendo-se concluído que a atividade antimicrobiana do OE sobre *Salmonella enterica* dependia da concentração e do tempo de exposição, aumentando o efeito antimicrobiano com o tempo de contacto.

Nos últimos anos, vários artigos têm descrito a ação antimicrobiana de OEs, e/ou dos seus componentes, sobre a formação de biofilmes e erradicação dos mesmos. No entanto, a aplicação desses OEs como desinfetantes de superfícies industriais contaminadas, pode ser prejudicada pelo odor forte e característico, e também pela dificuldade na sua eliminação de forma eficiente a partir de superfícies, principalmente devido à sua natureza hidrofóbica (Giaouris *et al.*, 2014). Estudos recentes têm demonstrado a capacidade de eliminação de biofilmes formados nos alimentos por OEs extraídos de tomilho, orégãos, erva-príncipe e canela, entre outros (Kerekes *et al.*, 2015). No entanto, é necessário continuar a investigar o impacto que agentes antimicrobianos têm nos biofilmes, de forma a contribuir para a descoberta de novas estratégias de controlo e a sua possível aplicação na indústria alimentar (Simões *et al.*, 2010).

Assim, pesquisas futuras devem explorar o modo de ação dos constituintes dos OEs individualmente, de forma a melhor esclarecer os seus efeitos sobre os microrganismos, potenciando as possíveis utilizações (Bhargava *et al.*, 2015; Hyldgaard *et al.*, 2012).

1.3.2 Bacteriocinas

As primeiras bacteriocinas a ser descritas foram as colicinas, que eram ativas contra *E. coli* (Gratia, 1925) e nos últimos anos têm vindo a ser identificadas muitas outras (Ramu *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014).

Bacteriocinas são proteínas ou pequenos peptídeos bacterianos produzidos ao nível dos ribossomas e com atividade inibitória (bacteriostática ou bacteriocida) sobre microrganismos alvo. As características de cada bacteriocina dependem do microrganismo produtor que, naturalmente, é imune à sua própria bacteriocina (Yang *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2012). Atualmente são conhecidas muitas bacteriocinas produzidas, tanto por bactérias Gram-positivas como por bactérias Gram-negativas, patogénicas ou não (Settanni e Corsetti, 2008). Porém, estes pequenos peptídeos produzidos pelas bactérias ácido lácticas, têm recebido maior atenção em termos de segurança alimentar, devido ao seu potencial uso como conservantes naturais (Settanni e Corsetti 2008; Yang *et al.*, 2012). As bacteriocinas, geralmente, atuam através da despolarização da membrana da célula alvo, formando poros, ou por meio da inibição da síntese da parede celular (Mills *et al.*, 2011).

A aplicação das bacteriocinas nos alimentos pode oferecer vários benefícios, tais como o prolongamento do tempo de armazenamento, a diminuição do risco de disseminação de microrganismos patogénicos, a redução da aplicação de conservantes químicos, bem como a redução dos custos devido à deterioração do alimento (Gálvez *et al.*, 2007). Uma das formas para tentar melhorar a sua eficácia na preservação de alimentos, é usá-las em combinação. Várias bacteriocinas têm demonstrado efeito aditivo ou sinérgico, quando usadas em combinação com outros agentes antimicrobianos, incluindo conservantes químicos, compostos fenólicos naturais (como OEs) ou outras proteínas antimicrobianas (Chen *et al.*, 2014; Gálvez *et al.*, 2007). Paralelamente, estudos anteriores demonstraram que a presença de cloreto de sódio aumentou a ação antimicrobiana de bacteriocinas, como a nisina, leucocin F10, enterocina AS-48 e outras. A combinação de nisina com o nitrito retardou a formação da toxina do botulismo em alimentos à base de carne, e foi verificada ação

sinérgica entre a nisina e os compostos naturais carvacrol, eugenol e timol sobre *Bac. cereus*, *L. monocytogenes*, *Bac. subtilis* e *L. innocua* (Gálvez *et al.*, 2007).

Desde 1969, a nisina é a única bacteriocina que pode ser usada como conservante natural na indústria alimentar, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS). É um péptido antimicrobiano catiónico, hidrófobo, formado por 34 aminoácidos com massa molecular inferior a 5 kDa, produzida por *Lactococcus lactis* e estável a temperaturas elevadas (Chen *et al.*, 2014; Gharsallaoui *et al.*, 2016). Atualmente é usada em mais de 50 países (Abdullah *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2014), sendo que na União Europeia, pela Diretiva 95/2/CE, a nisina (E234) é autorizada para a conservação dos alimentos, nomeadamente para a preservação do leite pasteurizado, queijos curados e fundidos e sopas e vegetais enlatados (Gharsallaoui *et al.*, 2016). Apresenta uma ampla gama de atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, como, por exemplo, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *Bac. cereus* e uma fraca atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas (Ramu *et al.*, 2015). Adicionalmente, a nisina pode induzir a apoptose celular e inibir o crescimento bacteriano. Todavia, a eficácia da nisina é frequentemente afetada por fatores ambientais, tais como pH, temperatura, baixa estabilidade e composição dos alimentos (Chen *et al.*, 2014; Olasupo *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2013).

1.4 Objetivos do trabalho

Vários microrganismos presentes nos alimentos são considerados agentes patogénicos emergentes e/ou deteriorativos, entre os quais estão incluídos os membros dos géneros *Enterococcus* spp., *Listeria* spp., *Aeromonas* spp. e *Brochothrix* spp. Devido à resistência que os microrganismos vão ganhando aos compostos químicos atualmente utilizados na indústria alimentar e medicina, surgiu a necessidade de diversificar os estudos dirigidos para compostos antimicrobianos naturais, como os OEs (de origem vegetal) e as bacteriocinas (de origem microbiana), que apresentam ação antimicrobiana sobre microrganismos patogénicos e/ou deteriorativos, de forma a reforçar a segurança alimentar. Esta situação representa uma questão de vital importância a nível mundial devido ao aumento das doenças veiculadas pelos alimentos.

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivos:

- ✓ Estudar os parâmetros de crescimento de isolados de *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* e *B. thermosphacta* a temperaturas de refrigeração e processamento dos alimentos, por comparação com a temperatura ótima de crescimento de cada microrganismo em análise.
- ✓ Avaliar a capacidade de formação de biofilme dos microrganismos supracitados em superfícies tais como poliestireno e aço inoxidável, normalmente utilizadas em indústrias alimentares, a diferentes temperaturas;
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana do OE_{tomilho} e do OE_{erva-príncipe}, e de uma bacteriocina nisina, sobre culturas puras e mistas de microrganismos de origem alimentar e clínica.
- ✓ Estudar a ação dos OEs na erradicação de biofilmes, formados por culturas puras e mistas.

2 Materiais e Métodos

2.1 Microrganismos em estudo e manutenção das culturas

Neste estudo foram analisados vários microrganismos, nomeadamente: *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* e *B. thermosphacta*. Na Tabela 2.1. encontra-se a listagem dos isolados analisados, as respetivas origens e temperaturas ótimas de crescimento.

Tabela 2.1. Microrganismos em estudo.

Designação	Código utilizado neste estudo	Espécie	Origem	Temperatura ótima de crescimento
QSE123 ¹	E1	<i>E. faecalis</i>	Alimentar	Entre 25 e 37°C
V583	E2	<i>E. faecalis</i>		
CECT 937	L1	<i>L. monocytogenes</i>	Clínica humana	
CECT 935	L2	<i>L. monocytogenes</i>		
A259 ²	A1	<i>A. hydrophila</i>		Entre 22 e 37°C
ATCC 11509 ^T	B1	<i>B. thermosphacta</i>	Alimentar	Entre 20 e 30°C

¹ gentilmente cedida por Doutora Teresa Crespo (Lab - Microbiology of Man-made Environments, IBET (Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, Portugal)

² gentilmente cedida por Dr^a Joana Selada (Hospital de Cascais Dr. Joaquim de Almeida, Portugal)

ATCC, American Type Culture Collection

CECT, Colección Española de Cultivos Tipo

^T estirpe-tipo

Durante o presente estudo, os microrganismos conservados a -80°C em BHI (Brain Heart Infusion, Scharlau, Spain) com 20% de glicerol (v/v) foram transferidos para placas de BHI sólido, incubados em estufa durante 24 h e mantidos a 4°C após crescimento. Ao longo do trabalho foram cultivados em 5 mL de meio BHI líquido e incubados a 25°C para *B. thermosphacta* e 37°C para *E. faecalis*, *L. monocytogenes* e *A. hydrophila*, durante aproximadamente 24 h.

Para realização dos ensaios subsequentes foram preparadas novas suspensões bacterianas, de acordo com o procedimento abaixo indicado:

- Preparar em cuvete uma diluição de 1:10 de cada cultura bacteriana e medir a densidade ótica (DO) a um comprimento de onda de 600 nm num espectrofotómetro (Pharmacia Biotech Ultrospec 2000);
- Recolher o volume necessário para microtubos e centrifugar durante 3 min a 15 885 g (Eppendorf, Cenytrifuge 5415R);
- Descartar o sobrenadante e ressuspender o sedimento em 100 µL de BHI, de modo a obter um inóculo com uma concentração inicial de 1×10^9 UFC/mL.

Nota: Sabendo-se que $1 \text{ U.A.} = 5 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$, a leitura a 600 nm foi necessária para determinar o volume a utilizar para obter $1 \times 10^9 \text{ UFC/mL}$ em cada suspensão bacteriana (Moran *et al.*, 2010).

2.2 Curvas de crescimento a diferentes temperaturas

A curva de crescimento permite estudar a evolução de uma cultura bacteriana ao longo do tempo. Durante o presente estudo foi utilizado o aparelho de leitura de microplacas (FluostarOptima, BMG LABTECH) para medir a DO_{600} , com o objetivo de estudar o desenvolvimento bacteriano dos isolados em análise a cinco temperaturas distintas: 4, 12, 20, 25 e 37°C. Para cada cultura bacteriana foram analisadas seis réplicas (técnicas).

A Figura 2.1. esquematiza a microplaca de 96 poços (Nunc™, Thermo Fisher Scientific Inc, Denmark) utilizada neste ensaio, de acordo com o procedimento abaixo indicado:

- Preparar suspensões bacterianas (1×10^9 UFC/mL) a partir de culturas frescas (ver 2.1.);
- Distribuir 297 μ L de BHI em cada poço nas primeiras quatro linhas;
- Adicionar 3 μ L de cada suspensão bacteriana (a diluição final de 1:100 em cada poço, de acordo com o esquema que se segue (Figura 2.1.);

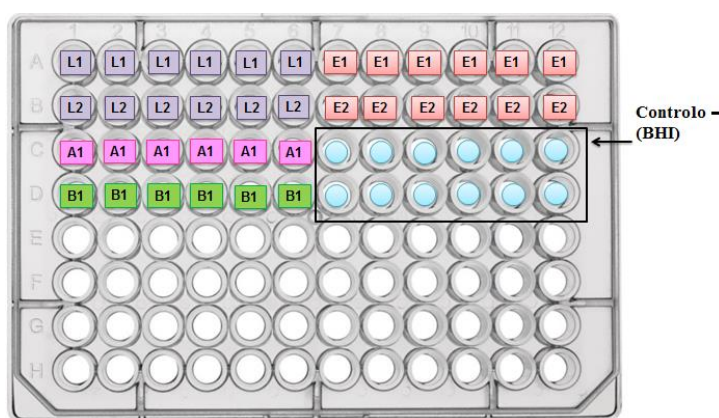


Figura 2.1. Esquema representativo da microplaca utilizada para o estudo das curvas de crescimento bacteriano a diferentes temperaturas (4, 12, 20, 25 e 37°C).

L1 – *L. monocytogenes* CECT 937; L2 – *L. monocytogenes* CECT 935; E1 – *E. faecalis* QSE123; E2 – *E. faecalis* V583; A1 – *A. hydrophila* A259; B1 – *B. thermosphacta* ATCC 11509^T

O controlo negativo (BHI não inoculado). Para cada isolado foram realizadas seis réplicas por microplaca.

- Medir a DO_{600} após agitação durante 30 s num leitor de microplacas (t_0 , ponto inicial da curva de crescimento);
- Incubar a microplaca à temperatura pretendida;
- Ler a DO_{600} periodicamente num leitor de microplacas (de uma em uma hora, ou de duas em duas horas).

A medição da DO_{600} permitiu estudar para cada isolado e para cada temperatura de incubação a evolução da curva de crescimento, até que fossem definidas as respetivas fases: latência, exponencial e estacionária. A fase exponencial foi utilizada para o cálculo da taxa específica de crescimento (μ) para as diferentes condições testadas. O valor de μ é expresso em h^{-1} e corresponde ao declive da reta representada pela seguinte equação (Hall *et al.*, 2013):

$$\mu = \frac{\ln DO_{600f} - \ln DO_{600i}}{t_f - t_i}$$

μ – taxa específica de crescimento;

$\ln DO_{600f}$ – logaritmo da densidade óptica a 600 (no tempo t_f);

$\ln DO_{600i}$ – logaritmo da densidade óptica a 600 (no tempo t_i);

t_f – tempo correspondente ao final da fase exponencial;

t_i – tempo correspondente ao início fase exponencial.

2.3 Avaliação da capacidade de formação de biofilme

Para a avaliação da capacidade de formação de biofilme foram utilizadas duas superfícies distintas: microplacas de poliestireno de 96 poços (Nunc™, Thermo Fisher Scientific Inc, Denmark) com tampa em espigão (Nunc™ Transferable Solid Phases Screening System, Fisher Scientific Inc.,Denamark) e discos de aço inoxidável.

2.3.1 Formação de biofilme em microplacas de poliestireno com tampa em espigão

Neste ensaio foi usada a tampa em espigão representada na Figura 2.2. e foram estudadas temperaturas e períodos de incubação distintos. Foi medida a DO₆₀₀ num leitor de microplacas para determinar a quantidade de biofilme formado. Cada ensaio foi realizado em quadruplicado por microplaca (réplicas técnicas), sendo realizadas três réplicas biológicas (ensaios em dias distintos).

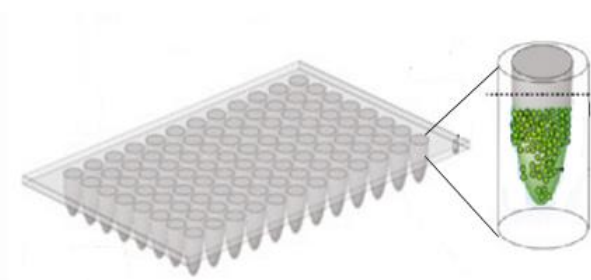


Figura 2.2. Esquema representativo da tampa em espigão. O biofilme encontra-se representado pelos círculos verdes à volta do espigão (figura adaptada de Harrison *et al.*, 2010).

Inicialmente a microplaca foi dividida em três partes (Figura 2.3.), de forma a cada porção corresponder a um período de incubação diferente: a 25°C durante 24, 48 e 72 h, e a 4°C durante 5, 12 e 16 dias.

No decorrer do trabalho experimental foi efetuado o seguinte procedimento:

- Preparar suspensões bacterianas (1×10^9 UFC/mL) a partir de culturas frescas (ver 2.1.);
- Distribuir 178,2 µL de BHI em cada um dos poços;
- Adicionar 1,8 µL de cada suspensão bacteriana correspondente às 72 h de incubação (diluição final de 1:100 em cada poço);

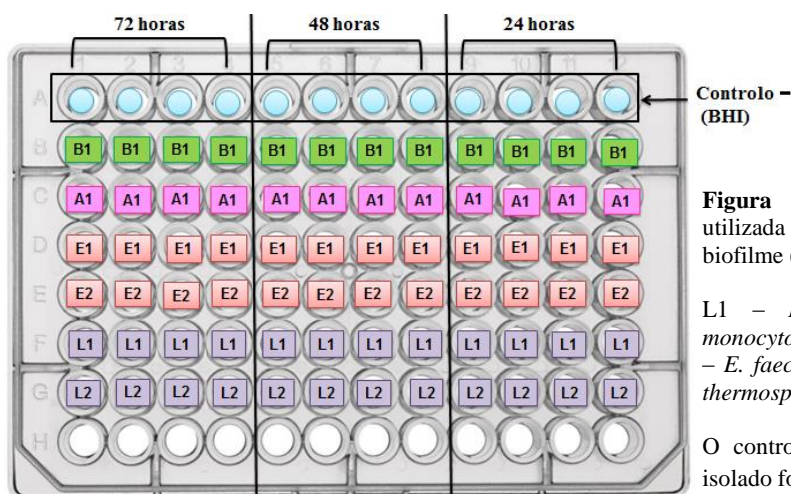


Figura 2.3. Esquema representativo da microplaca utilizada para avaliação da capacidade de formação de biofilme (culturas puras).

L1 – *L. monocytogenes* CECT 937; L2 – *L. monocytogenes* CECT 935; E1 – *E. faecalis* QSE123; E2 – *E. faecalis* V583; A1 – *A. hydrophila* A259; B1 – *B. thermosphacta* ATCC 11509^T

O controlo negativo (BHI não inoculado). Para cada isolado foram realizadas quatro réplicas por microplaca.

- Cobrir a microplaca com a tampa em espigão de poliestireno e incubar a 25°C. Após 24 h inocular os poços correspondentes às 48 h e no dia seguinte os poços correspondentes às 24 h. Obtém-se assim uma microplaca completa com crescimento bacteriano em três períodos de tempo distintos que será incubada a 25°C durante 24 h;
- Lavar a tampa numa microplaca de lavagem por imersão em 180 µL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4);
- Colocar a tampa numa nova microplaca com 180 µL de tampão fosfato 0,1 M com 0,1% tween 80 (v/v) em cada poço;
- Colocar a mesma no banho de ultrassons (Grant, Ultrasonic bath, England) durante 20 min, para facilitar a desagregação do biofilme;
- Substituir a tampa em espigão por uma tampa normal e medir a DO₆₀₀ num leitor de microplacas;

Nota 1: É de salientar que a microplaca incubada a 4°C tem os tempos de incubação correspondentes a 5, 12 e 16 dias.

Nota 2: O tampão fosfato 1 M, corresponde a fosfato de potássio monobásico 1 M, fosfato de potássio dibásico 1 M, cloreto de sódio 5 M.

Após a leitura dos valores de DO₆₀₀ foram calculadas as médias das réplicas e subtraiu-se o valor do controlo de esterilidade. Permitiu-se assim, analisar a capacidade da formação de biofilme a 4 e 25°C, tendo como superfície de crescimento o poliestireno.

Paralelamente foi realizado um ensaio equivalente utilizando culturas mistas em vez de culturas puras. Foram preparadas as combinações bacterianas abaixo indicadas (Figura 2.4.) num volume final de 100 µL. O volume adicionado de cada suspensão bacteriana dependeu do número de isolados que se pretendia combinar.

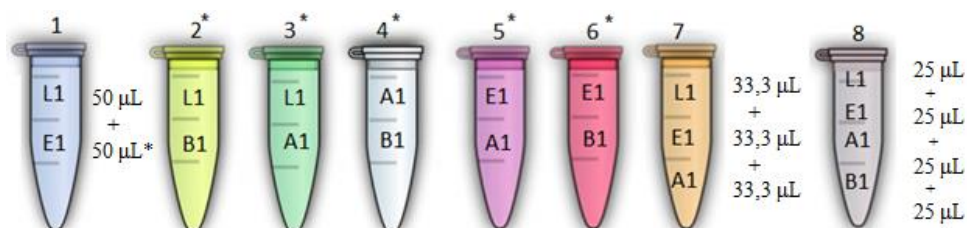


Figura 2.4. Combinações bacterianas analisadas.

L1 – *L. monocytogenes* CECT 937; L2 – *L. monocytogenes* CECT 935; E1 – *E. faecalis* QSE123; E2 – *E. faecalis* V583; A1 – *A. hydrophila* A259; B1 – *B. thermosphacta* ATCC 11509^T.

Os valores representam os volumes necessários para cada combinação. *foram utilizadas as mesmas quantidades.

Para testar a capacidade da formação de biofilme em poliestireno com culturas mistas (Figura 2.5.), utilizou-se o procedimento acima mencionado. A combinação L1 + E1 + A1 + B1 foi inoculada numa microplaca à parte devido ao número de poços necessários superar os existentes na microplaca.

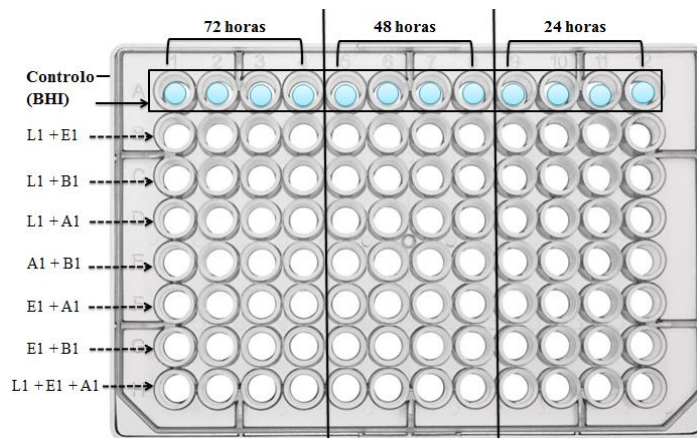


Figura 2.5. Esquema representativo da microplaca utilizada para avaliação da capacidade de formação de biofilme (combinações bacterianas).

L1 – *L. monocytogenes* CECT 937; L2 – *L. monocytogenes* CECT 935; E1 – *E. faecalis* QSE123; E2 – *E. faecalis* V853; A1 – *A. hydrophila* A259; B1 – *B. thermosphacta* ATCC 11509^T

O controlo negativo (BHI não inoculado). Para cada isolado foram realizadas quatro réplicas por microplaca.

2.3.2 Formação de biofilme em discos de aço inoxidável

Para o estudo da formação de biofilme em discos de aço inoxidável foram usadas placas de 24 poços (VWR®, Tissue Culture Plates, China) com discos de aço inoxidável e duas temperaturas de incubação: 4°C durante 12 dias e 25°C durante 48 h. Foi medida a DO₆₀₀ num leitor de microplacas para determinar a quantidade de biofilme formado. Cada ensaio foi realizado em triplicado em cada placa, tendo sido realizadas três réplicas biológicas (ensaio em dias independentes).

Para este ensaio foi efetuado o seguinte procedimento:

- Preparar suspensões bacterianas (1×10^9 UFC/mL) a partir de culturas frescas (ver 2.1.);
- Distribuir 990 µL de BHI em cada poço (de acordo com o esquema da Figura 2.6);
- Adicionar 10 µL de cada suspensão bacteriana (diluição final de 1:100 em cada poço);
- Colocar, com ajuda de uma pinça estéril, os discos de aço inoxidável estéreis em cada poço;

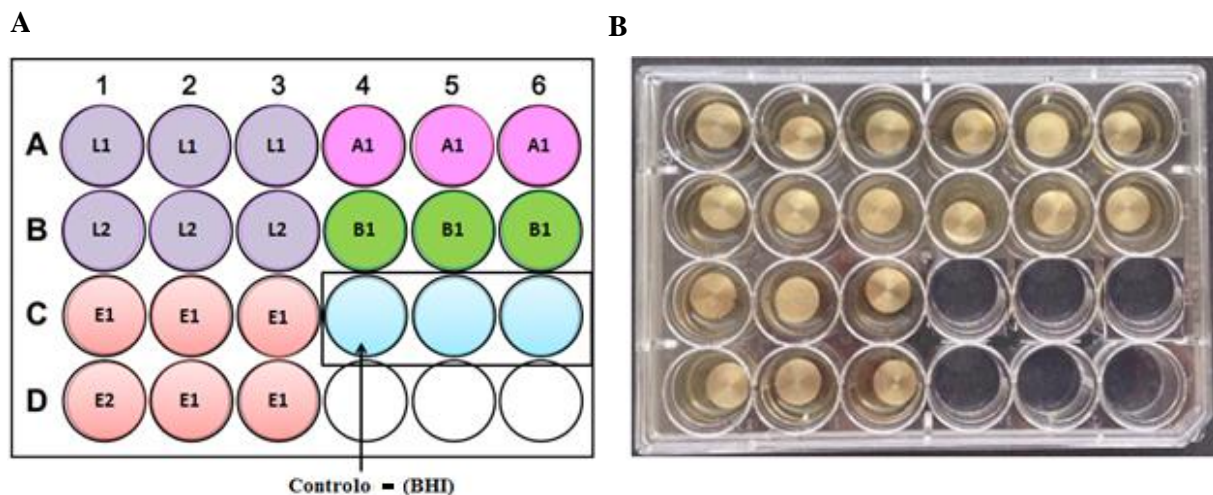


Figura 2.6. Esquema representativo da microplaca com discos de aço inoxidável.

L1 – *L. monocytogenes* CECT 937; L2 – *L. monocytogenes* CECT 935; E1 – *E. faecalis* QSE123; E2 – *E. faecalis* V583; A1 – *A. hydrophila* A259; B1 – *B. thermosphacta* ATCC 11509^T.

Na Figura 2.6.A está representado o controlo negativo (BHI não inoculado), sendo para cada isolado realizadas três réplicas por placa. Na Figura 2.6.B estão representados os discos de aço inoxidável.

- Incubar a placa a 25°C durante 48 h;

- Retirar os discos de aço inoxidável com uma pinça estéril. Lavar cada disco de aço inoxidável com 3 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4), com ajuda de uma pipeta de Pasteur descartável;
- Colocar os discos numa nova placa com 1000 µL de tampão fosfato 0,1 M e 0,1% tween 80 (v/v);
- Colocar a placa no banho de ultrassons durante 40 min de modo a facilitar a desagregação do biofilme;
- Retirar os discos de aço inoxidável e transferir o meio com culturas de células da placa de 24 poços para uma microplaca de 96 poços;
- Medir a DO₆₀₀ num leitor de microplacas.

Nota 1: Os discos foram previamente esterilizados em autoclave, durante 20 min a 121°C.

Nota 2: Incubar a placa a 4°C durante 12 dias.

Após a leitura dos valores de DO₆₀₀ foram calculadas as médias das réplicas e foi subtraído o valor do controlo negativo. Permitiu-se assim, analisar a capacidade da formação de biofilme a 4 e 25°C, tendo como superfície de crescimento o aço inoxidável.

Paralelamente, foi realizado um ensaio equivalente utilizando culturas mistas em vez de culturas puras. As combinações foram preparadas, tal como foi descrito no ponto 2.1.3.1 e representado na Figura 2.4. A combinação L1 + E1 + A1 + B1 foi inoculada numa microplaca à parte, usando o mesmo procedimento.

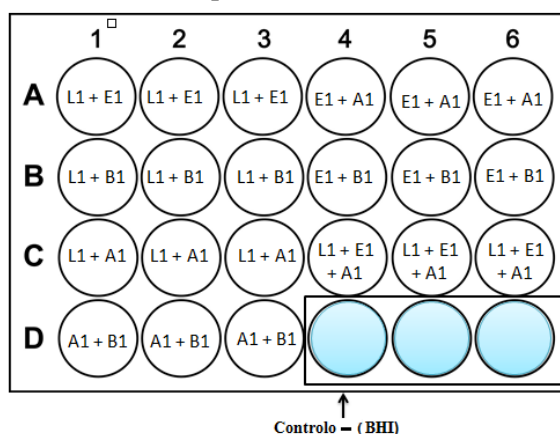


Figura 2.7. Esquema representativo da placa com discos de aço inoxidável (combinações bacterianas).

L1 – *L. monocytogenes* CECT 937; L2 – *L. monocytogenes* CECT 935; E1 – *E. faecalis* QSE123; E2 – *E. faecalis* V583; A1 – *A. hydrophila* A259; B1 – *B. thermosphacta* ATCC 11509[†]

O controlo negativo (BHI não inoculado). Para cada isolado foram realizadas três réplicas por placa.

2.4 Agentes antimicrobianos: Óleos essenciais e nisina

Na Tabela 2.2 estão representados os OEs utilizados neste estudo (adquiridos de New Directions Aromatics Inc. Canadá). A bacteriocina comercial utilizada foi a nisina (SIGMA-ALDRICH, de *Lactococcus lactis*, ≥1,000,000 UI/g, referência 1414-45-5).

Tabela 2.2 OEs utilizados neste estudo.

Nome Botânico	Nome do produto	Parte da planta	Origem	Código do produto	Componentes maioritários
<i>Thymus vulgaris</i>	Thyme Red (Natural Blend) Essential Oil	Folhas	India	90015-A01	Timol 31,2 %
<i>Cymbopogon flexuosus</i>	Lemongrass Organic Essential Oil	Folhas	India	50032-A18	Citral 76,3 %

As informações relativamente à caracterização dos OEs foram retiradas dos Certificados de Análises fornecidos pela New Directions Aromatics Inc.

Inicialmente, os stocks de cada OE foram preparados em 0,15% agar (Agar-Agar, Scharlau, Espanha). Para isso, numa proporção de 1:1 (v/v), pesando 1 mL de cada OE e 1 mL de agar 0,15%, foi obtida a concentração inicial de 497,6 µg/µL de OE_{tomilho} e 499,2 µg/µL de OE_{erva-príncipe}. A partir dessas soluções stock foram realizadas diluições de 1:2 (v/v) em 0,15% agar de forma a obter as concentrações necessárias para cada ensaio. De salientar que, sempre que os OEs foram utilizados, foi necessário proceder a uma homogeneização cuidada por agitação em vortex.

A solução stock de nisina, foi preparada dissolvendo em HCl 0,02 N, para obter uma concentração final de 100 UI/µL.

2.4.1 Método da difusão em meio sólido: *screening* inicial

O ensaio de difusão foi efetuado de acordo com a metodologia previamente descrita (CLSI, 2014), com o objetivo de testar a ação antimicrobiana dos compostos em estudo. Procedeu-se ao espalhamento de 100 µL de cada suspensão bacteriana (ver o ponto 2.1.) em placas de BHI agar com a ajuda de uma zaragatoa estéril. Previamente os OEs foram diluídos em 0,15% de agar (v/v) para a obtenção de uma concentração de 15 µg/µL, para a nisina utilizou-se a concentração inicial de 100 UI/µL. Posteriormente, 10 µL de cada composto antimicrobiano foram adicionados diretamente na placa, em triplicado (réplicas técnicas). Antes da incubação as placas foram mantidas a 4°C durante 2 h, para facilitar a difusão dos agentes antimicrobianos. Após 24 h de incubação a 25°C para todos os microrganismos, foram medidas as zonas de inibição com uma régua.

2.4.2 Método da microdiluição: Determinação das concentrações mínimas inibitórias, bactericidas e ação sinérgica de compostos antimicrobianos

As concentrações mínimas inibitórias (CMIs) foram determinadas por ensaio em meio líquido utilizando microplacas de 96 poços. A partir das soluções stock para cada OE foram efetuadas diluições sucessivas de 1:2 (v/v) de forma a obter a concentração inicial de 31,1 µg/µL de OE_{tomilho} e 31,2 de µg/µL de OE_{erva-príncipe}. Para a nisina não foram feitas diluições utilizando-se uma concentração inicial de 100 UI/µL.

A Figura 2.8. esquematiza a organização da microplaca para a qual foram efetuados os seguintes passos:

- Preparar suspensões bacterianas (1×10^9 UFC/mL) a partir de culturas frescas (ver 2.1.);
- Distribuir 148,5 µL de BHI em todos os poços da microplaca;
- Colocar em toda a segunda coluna da microplaca 150 µL de cada composto antimicrobiano e realizar diluições 1:2 até à penúltima coluna;
- Adicionar 1,5 µL de suspensão bacteriana em cada poço (inocular cada isolado obtendo a diluição final de 1:100 em cada poço);
- Incubar a microplaca a 25°C durante 48 h.

Nota 1: No caso do estudo da atividade antimicrobiana da nisina, a segunda coluna da placa não foi preenchida com o BHI. Nesta, foram adicionadas 150 µL de nisina numa concentração de 100 UI/µL.

Nota 2: No caso da nisina só a partir da terceira coluna realizar diluições 1:2 até à penúltima coluna.

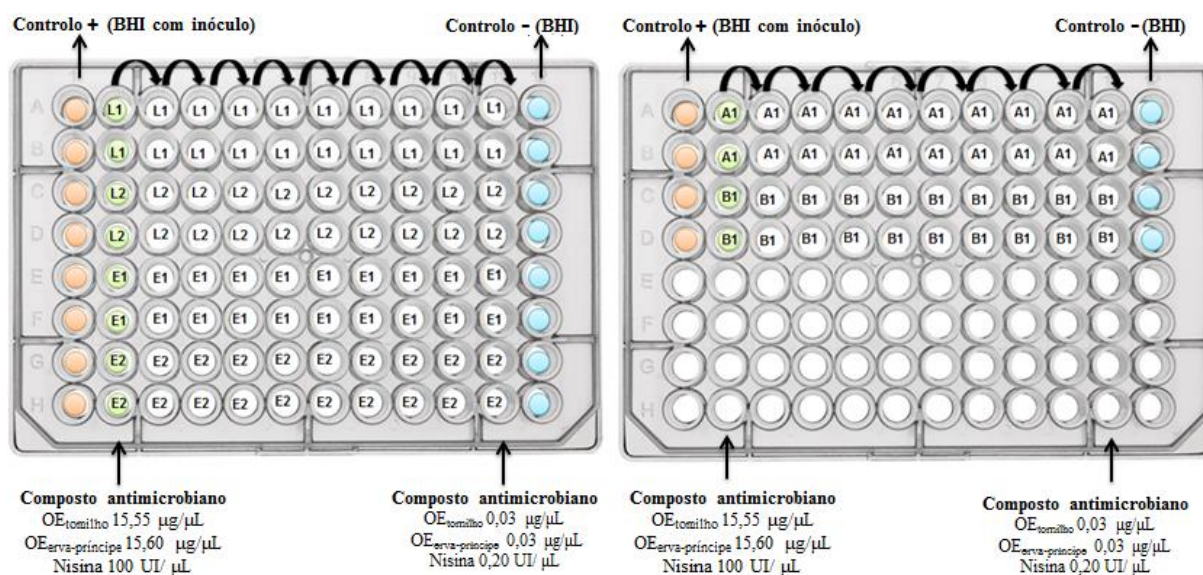


Figura 2.8. Esquema representativo de duas microplacas utilizadas na determinação das concentrações mínimas inibitórias e concentrações mínimas bactericidas para as culturas puras.

L1 – *L. monocytogenes* CECT 937; L2 – *L. monocytogenes* CECT 935; E1 – *E. faecalis* QSE123; E2 – *E. faecalis* V583; A1 – *A. hydrophila* A259; B1 – *B. thermosphacta* ATCC 11509^T.

O controlo negativo (BHI não inoculado). O controlo positivo (BHI com inóculo) serve como controlo de crescimento bacteriano. Para cada isolado foram realizadas duas réplicas por microplaca.

A concentração mínima inibitória (CMI) foi definida como a menor concentração em que não se observou crescimento bacteriano em microplaca.

Este ensaio teve como objetivo verificar o efeito bactericida e/ou bacteriostático que os compostos antimicrobianos exercem sobre os isolados devido à presença ou ausência de colónias. Assim, dos poços sem turvação visível foram retirados 10 µL de suspensão bacteriana, inoculados em placas de BHI agar e incubados a 25°C para todos os microrganismos, durante 24 h. A concentração mínima bactericida (CMB) corresponde à menor concentração de composto antimicrobiano que permitiu reduzir o crescimento bacteriano em 99,9% (que corresponde à ausência do crescimento nas placas de BHI).

Adicionalmente, foi estudada a atividade antimicrobiana dos compostos naturais sobre culturas mistas de microrganismos. O procedimento foi idêntico ao supramencionado, estando o esquema representado na Figura 2.9.

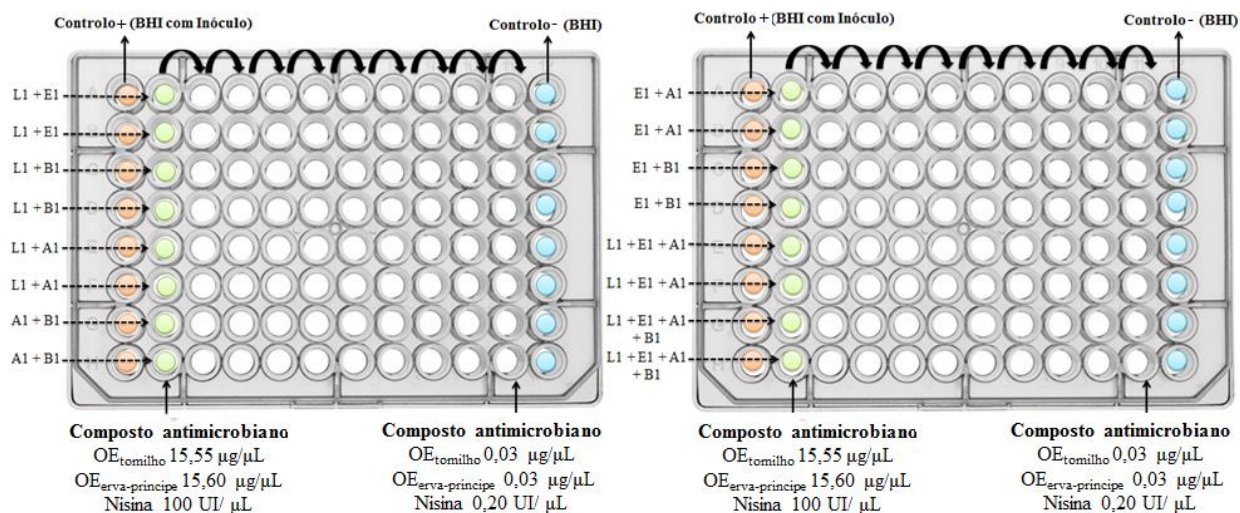


Figura 2.9. Esquema representativo da microplaca utilizada na determinação das concentrações mínimas inibitórias e concentrações mínimas bactericidas para culturas mistas.

L1 – *L. monocytogenes* CECT 937; L2 – *L. monocytogenes* CECT 935; E1 – *E. faecalis* QSE123; E2 – *E. faecalis* V583; A1 – *A. hydrophila* A259; B1 – *B. thermosphacta* ATCC 11509[†].

O controlo de esterilidade (BHI não inoculado). O controlo (BHI com inóculo) serve como controlo de crescimento bacteriano. Para cada isolado foram realizadas duas réplicas por microplaca.

Foi ainda analisada a atividade sinérgica (ou antagonista) entre os compostos antimicrobianos em estudo. Para tal foram feitas combinações entre os compostos antimicrobianos tendo sido preparadas as combinações num volume final de 1500 µL (Figura 2.10.).

Todo o procedimento e a forma de distribuição de cada combinação de compostos antimicrobianos foram realizados de maneira igual ao esquema anteriormente apresentado (na determinação das CMI's para os OEs e a nisina, ver o ponto 2.4.2).

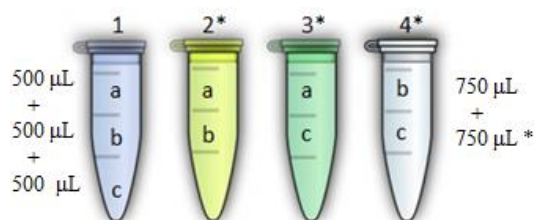


Figura 2.10. Combinações de compostos antimicrobianos em análise.

Legenda: a- OE_{tomilho}; b – OE_{erva-príncipe}; c- nisina.
*foram idênticas as quantidades utilizadas.

Com o objetivo de estudar a existência (ou não) de ação sinérgica entre os compostos em análise, foi calculado o Índice da Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) para cada combinação. Primeiramente, foi calculada a Concentração Inibitória Fracionada (CIF) de cada composto antimicrobiano (em relação a cada um dos microrganismos testados), de acordo com as seguintes equações:

$$CIF(OE_{tomilho})_M = \frac{CMI_c \text{ de } OE_{tomilho}}{CMI_i \text{ } OE_{tomilho}}$$

$$CIF(OE_{erva_príncipe})_M = \frac{CMI_c \text{ de } OE_{erva_príncipe}}{CMI_i \text{ } OE_{erva_príncipe}}$$

$$CIF(Nisina)_M = \frac{CMI_c \text{ de } nisina}{CMI_i \text{ de } nisina}$$

CIF – Concentração Inibitória Fracionada;

M – Microrganismo considerado;

CMI_c – Concentração Mínima Inibitória quando em combinação;

CMI_i – Concentração Mínima Inibitória individual.

De seguida, dependendo da combinação realizada, foram somados os CIFs dos compostos antimicrobianos em questão, dando-se abaixo exemplo do calculo à efetuar para análise do efeito dos três compostos antimicrobianos.

$$\text{ICIF} [\text{OE}_{\text{tomilho}} + \text{OE}_{\text{erva-príncipe}} + \text{Nisina}] = [\text{CIF}(\text{OE}_{\text{tomilho}}) + \text{CIF}(\text{OE}_{\text{erva-príncipe}}) + \text{CIF}(\text{Nisina})]$$

O índice CIF foi interpretado como a presença de interação sinérgica quando o valor for $<0,33$; aditivo quando o valor for $0,33 \leq \text{ICIF} \leq 1$; indiferente $1 < \text{ICIF} < 3$ e antagónico quando o valor de $\text{ICIF} > 3$, adaptado de acordo com as classes definidas por Kerekes *et al.*, 2015.

2.4.3 Determinação da ação de óleos essenciais na erradicação de biofilmes

Para avaliar a capacidade de erradicação de biofilme pelos dois OEs, foi adaptada a técnica descrita por Ceri *et al.* 1999 utilizando microplacas de 96 poços com a tampa em espigão, os ensaios foram realizados em triplicado (réplicas biológicas) (Figura 2.11.).

A metodologia foi realizada da seguinte forma:

- Preparar suspensões bacterianas (1×10^9 UFC/mL) a partir de culturas frescas (ver 2.1.);
- Distribuir 178,2 μL de BHI em cada poço;
- Adicionar 1,8 μL de cada suspensão bacteriana (diluição final de 1:100 em cada poço);
- Cobrir a microplaca com a tampa em espigão e incubar a 25°C , durante 48 h (tempo necessário para a formação do biofilme).

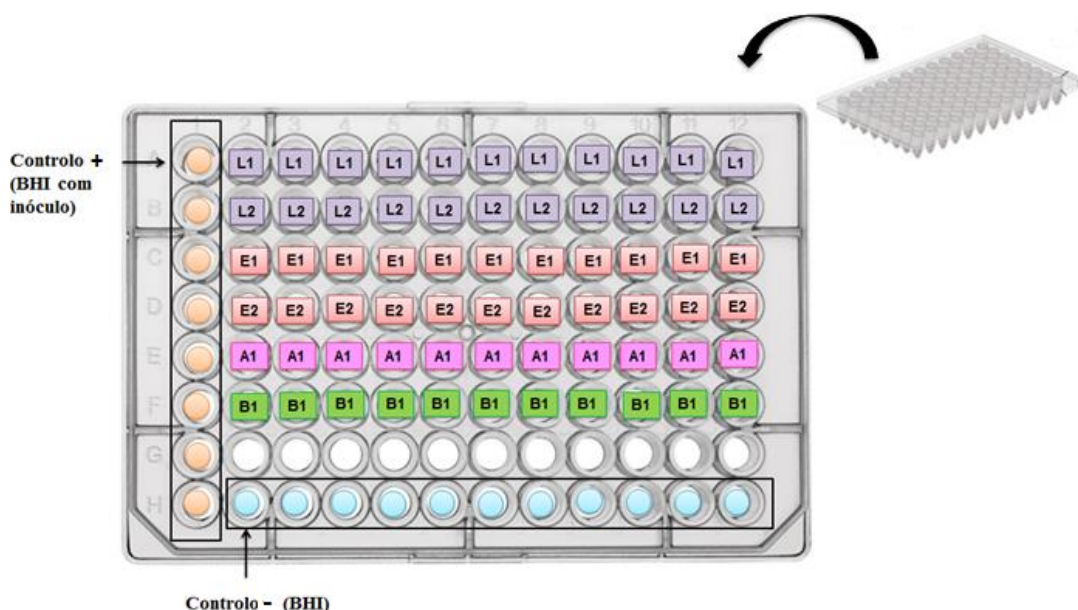


Figura 2.11. Esquema representativo da microplaca com formação de biofilme na tampa em espigão (culturas puras).

L1 – *L. monocytogenes* CECT 937; L2 – *L. monocytogenes* CECT 935; E1 – *E. faecalis* QSE123; E2 – *E. faecalis* V583; A1 – *A. hydrophila* A259; B1 – *B. thermosphacta* ATCC 11509^T

O controlo negativo (BHI não inoculado). O controlo positivo (BHI com inóculo) serve como controlo de crescimento bacteriano. Para cada isolado foram realizadas três réplicas em microplacas distintas.

Após a incubação, foi preparada uma nova microplaca com OEs (placa de erradicação):

- Distribuir 180 μL de BHI em todos os poços, com exceção da segunda coluna;
- Distribuir em toda segunda coluna 180 μL de cada OE;

- Colocar na terceira coluna da microplaca, 180 μL de cada OE e realizar múltiplas diluições 1:2 até à última coluna (Figura 2.12.);

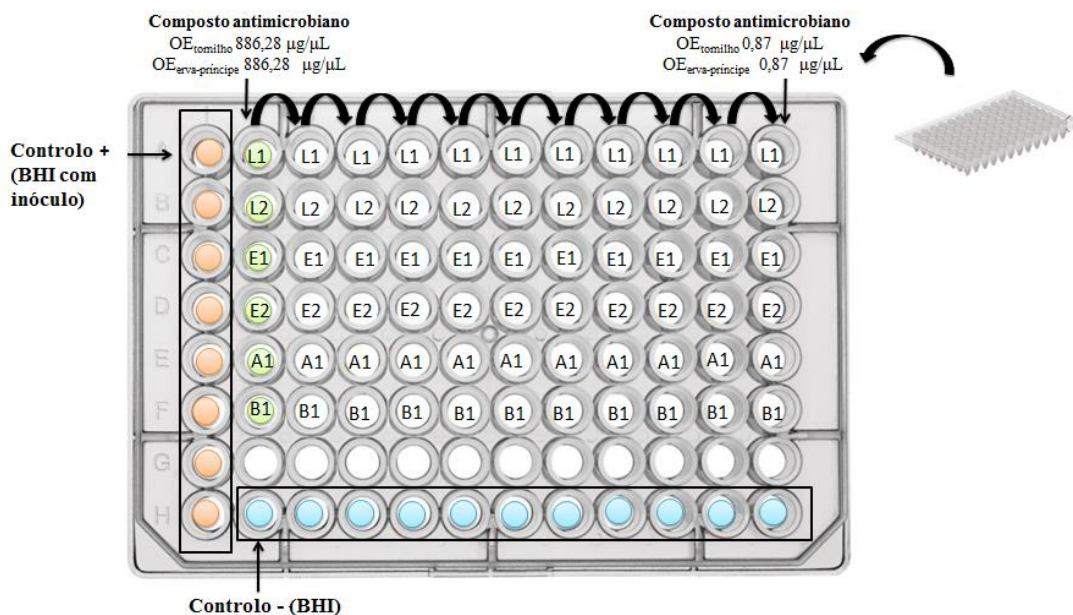


Figura 2.12. Esquema representativo da microplaca de erradicação de biofilme.

L1 – *L. monocytogenes* CECT 937; L2 – *L. monocytogenes* CECT 935; E1 – *E. faecalis* QSE123; E2 – *E. faecalis* V583; A1 – *A. hydrophila* A259; B1 – *B. thermosphacta* ATCC 11509^T

O controlo negativo (BHI não inoculado). O controlo positivo (BHI com inóculo) serve como controlo de crescimento bacteriano. Para cada isolado foram realizadas três réplicas em microplacas distintas.

- Colocar durante 30 min a tampa em espigão em contacto com diferentes concentrações de OE (placa de erradicação);
- Lavar a tampa em espigão três vezes por imersão em 180 μL tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) (placa de lavagem);
- Colocar a tampa em espigão numa nova microplaca com 180 μL de tampão fosfato 0,1 M e 0,1% tween 80 (v/v);
- Colocar a microplaca no banho de ultrassons durante 20 min;
- Trocar a tampa em espigão por uma tampa normal e medir a DO_{600} num leitor de microplacas;
- Retirar 10 μL de suspensão bacteriana de cada poço e inocular em placas de BHI agar;
- Incubar a 25°C durante 24 h.

A CMEB foi determinada com a menor concentração em que não se observou crescimento bacteriano nas placas de BHI agar.

Em paralelo foi realizado um ensaio de forma similar ao anterior com combinações bacterianas (Figura 2.13.), utilizando o procedimento anteriormente descrito. A combinação L1 + E1 + A1 + B1 foi inoculada da mesma forma mas numa microplaca à parte. O ensaio foi realizado equivalente.

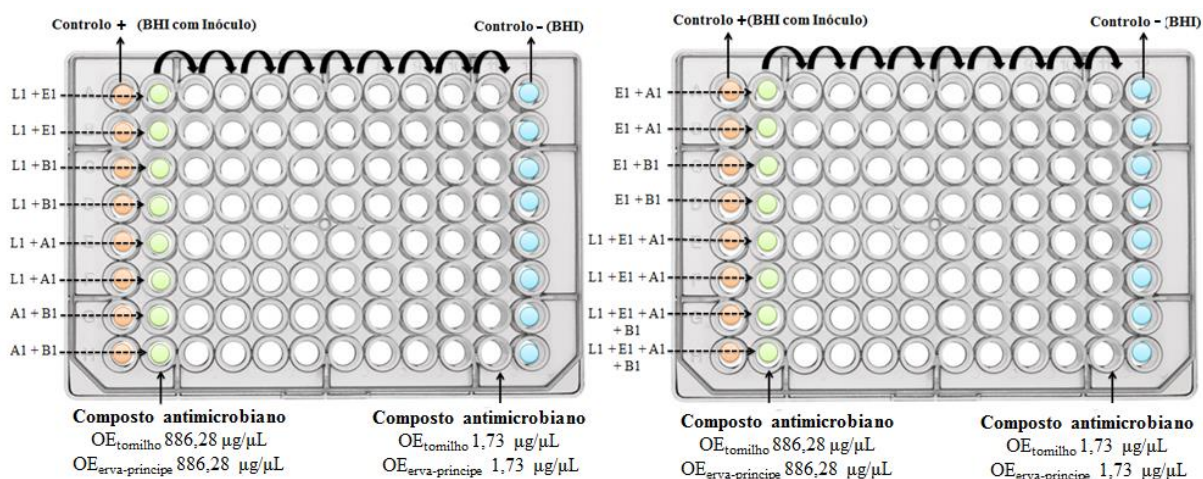


Figura 2.13. Esquema representativo da microplaca de erradicação de biofilme para as combinações bacterianas.

L1 – *L. monocytogenes* CECT 937; L2 – *L. monocytogenes* CECT 935; E1 – *E. faecalis* QSE123; E2 – *E. faecalis* V583; A1 – *A. hydrophila* A259; B1 – *B. thermosphacta* ATCC 11509^T

O controlo negativo (BHI não inoculado). O controlo positivo (BHI com inóculo) serve como controlo de crescimento bacteriano. Para cada isolado foram realizadas duas réplicas por microplaca.

2.5 Análise de dados

Para a análise de resultados recorreu-se ao software BM SPSS Statistics (Versão 23.0). Os resultados obtidos em ensaios de curvas de crescimento, difusão em meio sólido e formação de biofilme em diferentes superfícies foram utilizados para análise de variância de dois fatores (two-way ANOVA). Para além desta análise, com os resultados obtidos nas curvas de crescimento foi feita a confirmação *a posteriori* pelo teste de Tukey (Tukey posthoc test).

3. Resultados e Discussão

3.1 Curvas de crescimento a diferentes temperaturas

No presente estudo analisaram-se os parâmetros de crescimento de *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* e *B. thermosphacta*. Em primeiro lugar, com o intuito de estudar a evolução de cada microrganismo a diferentes temperaturas (4, 12, 20, 25 e 37°C), foi determinada a taxa específica de crescimento na fase exponencial (μ). O efeito das diferentes temperaturas foi analisado com o objetivo de simular a colonização bacteriana de produtos alimentares, durante o processamento e conservação dos mesmos.

Em termos de segurança alimentar, a utilização de temperaturas inadequadas durante a preparação/processamento dos produtos pode ser apontada como uma das principais causas de ocorrência do crescimento microbiano dos alimentos. Assim, relacionando com o presente estudo:

(i) a temperatura de 4°C corresponde à temperatura de refrigeração, um método de conservação de alimentos que permite reduzir ou inativar o crescimento dos microrganismos, prolongando a vida útil do alimento; (ii) a temperatura de 12°C corresponde a uma temperatura utilizada durante a manufatura/processamento de alguns alimentos; (iii) temperaturas entre os 20 e 37°C correspondem à gama de temperaturas ótimas de crescimento dos microrganismos em análise, valores estes a que os alimentos podem estar sujeitos desde a sua aquisição (saída da prateleira) até ao armazenamento em frigoríficos domésticos (Pinto e Neves, 2010).

Para análise das curvas de crescimento de cada população microbiana foi escolhido o método turbidimétrico, uma vez que permite medir a densidade ótica em tempo real. De acordo com Dalgaard e Koutsoumanis (2000), o método adotado tem a vantagem de ser económico e fácil de implementar, podendo existir limitações na deteção de densidades celulares reduzidas ($<1 \times 10^7$ UFC/mL). Uma vez que a concentração celular utilizada foi de 1×10^9 UFC/mL, acima do limite de deteção, esta desvantagem não se aplica a este estudo. A taxa específica de crescimento e a evolução dos microrganismos ao longo do tempo podem ser úteis em muitas áreas das ciências microbiológicas, como por exemplo, na caracterização dos efeitos induzidos por agentes antimicrobianos. Adicionalmente, em microbiologia alimentar é vantajoso conhecer o tempo necessário para que as bactérias patogénicas e/ou deteriorativas alcancem os limites críticos em diferentes condições de crescimento, contribuindo para a prevenção de efeitos nefastos (Dalgaard e Koutsoumanis, 2000).

Na Figura 3.1. estão representados os resultados obtidos para o crescimento bacteriano a cinco temperaturas diferentes. É de salientar que não foi efetuada a curva de crescimento para *B. thermosphacta* a 37°C, visto que a sua temperatura ótima de crescimento varia entre 20 a 30°C, enquanto para os outros géneros a mesma varia entre 22, 25 e 37°C (Tabela 2.1, Materiais e Métodos).

Analisando as curvas de crescimento, pode verificar-se que a duração da fase de latência foi diminuindo à medida que a temperatura de incubação foi aumentando. Magalhães *et al.* (2016) verificaram que as bactérias incubadas à temperatura ótima de crescimento apresentam ausência ou redução de tempo de latência e aumento da taxa específica de crescimento. O mesmo foi verificado neste estudo (Figura 3.1) em que à temperatura de 12°C, a duração do tempo de latência foi de, aproximadamente, 8/10 h, e a 37°C houve redução da duração da fase de latência, a qual passou a ter uma duração aproximada de 2 h.

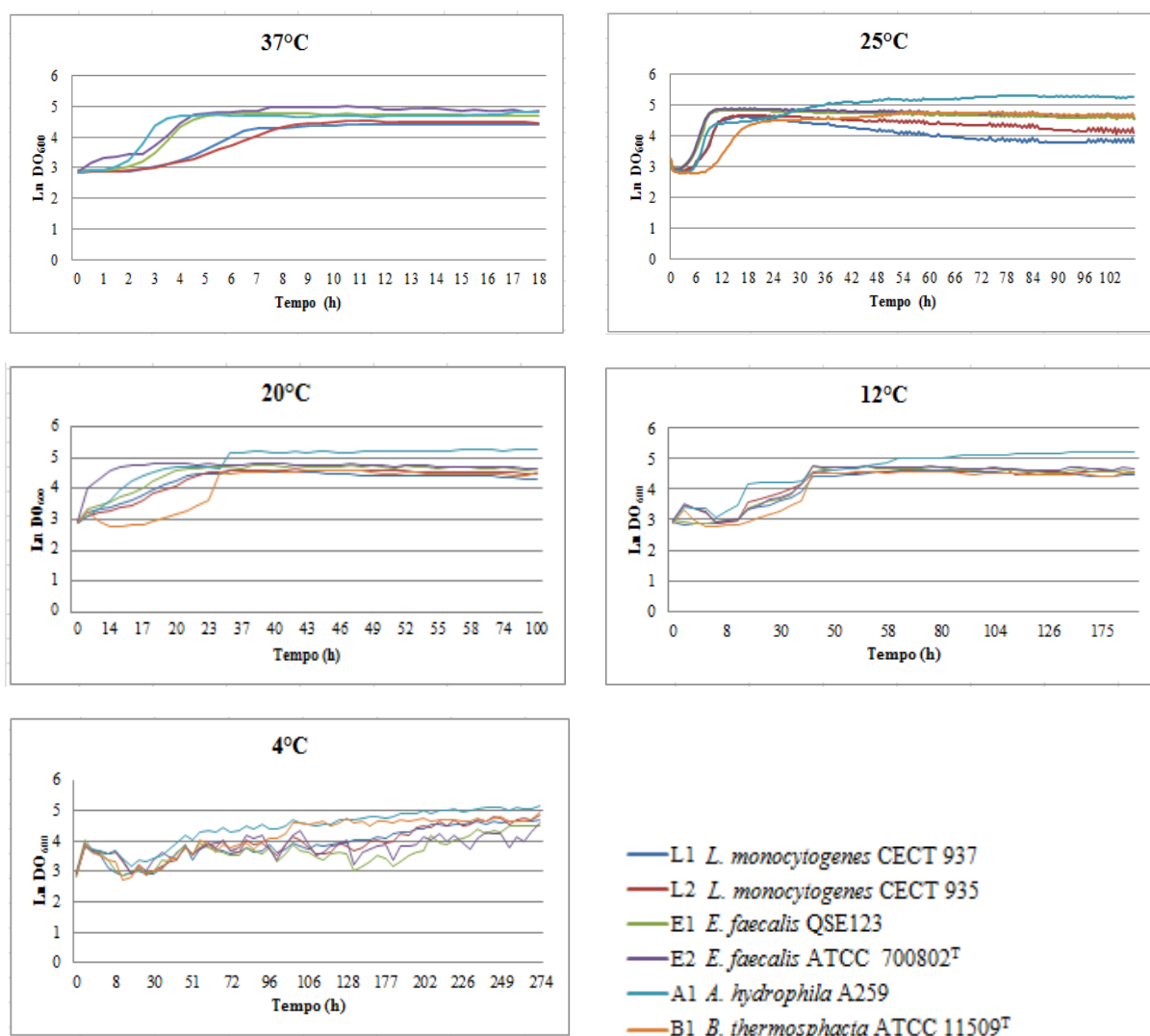


Figura 3.1. Curvas de crescimento microbiano nas cinco temperaturas em análise. Para cada temperatura estão representados seis microrganismos. O eixo das abcissas indica o tempo (horas) e o eixo das ordenadas o ln DO₆₀₀. As curvas de crescimento representam a média de seis réplicas.

Todos os microrganismos selecionados para este estudo apresentaram crescimento nas temperaturas analisadas. A capacidade de crescimento foi aumentando à medida que as temperaturas se aproximavam das temperaturas ótimas de crescimento bacteriano. Não foi possível determinar a taxa de crescimento a 4°C, uma vez que, apesar de se ter observado crescimento, os isolados não entraram na fase exponencial, contrariamente ao que foi observado nas restantes temperaturas (Figura 3.1). Este resultado pode estar relacionado com a baixa capacidade de crescimento e desenvolvimento microbiano a temperaturas de refrigeração, confirmando o facto de esta temperatura prolongar a vida útil dos alimentos.

Relativamente aos resultados obtidos para a taxa específica de crescimento (Tabela 3.1.), para todos os microrganismos analisados, a mesma variou em função da temperatura. Pode então afirmar-se que os isolados têm capacidade de adaptação e crescimento distintos, em função da temperatura.

Nos valores de temperatura mais baixos, a velocidade de crescimento foi mais lenta, variando a taxa de crescimento a 12°C entre os 0,04 e 0,07 h⁻¹. À medida que a temperatura foi aumentando, a

taxa de crescimento também aumentou, tendo sido obtido o valor mais elevado correspondente a 1,11 h⁻¹ para A1 a 37°C (Tabela 3.1.).

Tabela 3.1. Taxas específicas crescimento a diferentes temperaturas.

Microrganismos	12°C	20°C	25°C	37°C
L1 - <i>L. monocytogenes</i> CECT 937	0,04	0,14	0,25	0,40
L2 - <i>L. monocytogenes</i> CECT 935	0,04	0,16	0,25	0,32
E1 - <i>E. faecalis</i> QSE123	0,05	0,19	0,35	0,77
E2 - <i>E. faecalis</i> V583	0,06	0,31	0,41	0,74
A1 - <i>A. hydrophila</i> A259	0,04	0,26	0,49	1,11
B1 - <i>B. thermosphacta</i> ATCC 11509 ^T	0,07	0,09	0,18	-

Os valores representam a média das taxas de crescimento (μ) obtidas para cada microrganismo, expresso em h⁻¹. O desvio padrão obtido para todas as experiências foi sempre inferior a 0,03.

Os valores da taxa de crescimento correspondentes à temperatura de 12°C foram muito semelhantes entre os microrganismos em estudo (variaram entre 0,04 – 0,07 h⁻¹), sendo por vezes, obtido o mesmo valor, como se observou para os isolados L1, L2 e A1. Aos 20°C, foram obtidas taxas de crescimento superiores para os isolados E2 e A1 (0,31 e 0,26 h⁻¹, respetivamente). A 25°C, as taxas de crescimento dos isolados L1e L2 foram iguais (0,25 h⁻¹) e para os isolados E2 e A1 os valores foram muito aproximados (0,41 e 0,49 h⁻¹, respetivamente). Por fim, a 37°C para os isolados pertencentes ao género *Enterococcus* as taxas de crescimento foram muito próximas (E1=0,77 h⁻¹ e E2=0,74 h⁻¹).

Com o intuito de comprovar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre as taxas de crescimento obtidas, tendo em conta os dois fatores em estudo, microrganismo-alvo e temperatura de incubação, procedeu-se à análise de variância de dois factores (two-way ANOVA). Esta análise detetou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre si, ou seja, a taxa de crescimento depende não só do tipo de microrganismo em questão, como também da temperatura em estudo. De seguida, foi feito o teste de Tukey (Tukey posthoc test), que mostrou diferenças estatisticamente significativas entre os microrganismos em estudo. Contudo, não foi verificada essa diferença para os isolados pertencentes a um mesmo género, *Listeria* e *Enterococcus*.

Assim, no presente estudo, os microrganismos *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* e *B. thermosphacta*, revelaram possuir maior capacidade de crescimento na gama de temperaturas entre os 20 e 37°C, sendo estas as temperaturas a que os alimentos são mantidos durante um certo período de tempo após a saída das prateleiras, sendo necessário um maior cuidado por parte do consumidor. Relativamente à temperatura de 4°C, para os microrganismos referidos, é necessário ter especial atenção no seu controlo, visto que é a temperatura a que os alimentos são armazenados/conservados durante períodos mais longos de tempo (Franz *et al.*, 2011; Gavín *et al.*, 2002; Haubert *et al.*, 2015). Os resultados obtidos vêm reforçar o fato de que a temperatura é um dos fatores mais importantes na regulação do crescimento microbiano e são necessários os devidos cuidados e o controlo desta, para não comprometer a qualidade do produto.

Após análise dos resultados anteriormente obtidos, foram seleccionadas duas temperaturas de incubação, 4 e 25°C, para realização dos ensaios posteriores. A temperatura de 4°C, refrigeração, que muitas indústrias alimentares e superfícies comerciais utilizam para o armazenamento de alimentos (tal com o consumidor em sua casa), pois pode reduzir ou inativar o crescimento microbiano, favorecendo a manutenção da qualidade original do alimento e prologando a sua vida útil. A 25°C, para além de ser uma temperatura ótima de crescimento para maioria das bactérias em estudo, é um

valor de temperatura (temperatura ambiente) à qual o alimento está normalmente sujeito quando é retirado da prateleira.

3.2 Avaliação da capacidade de formação de biofilme

O biofilme formado por bactérias patogénicas é uma das principais fontes de contaminação alimentar, podendo constituir um risco para a saúde humana. Diversos fatores contribuem para a adesão dos microrganismos a determinadas superfícies e dependem não apenas da fisiologia dos mesmos, mas também da natureza do substrato ao qual aderem (Boari *et al.*, 2009). Assim, para diminuir o risco de contaminação a escolha do material a utilizar é de vital importância na conceção de superfícies de contacto e processamento de alimentos (Van Houdt e Michiels, 2010).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade de formação de biofilme em duas superfícies distintas, poliestireno e aço inoxidável. A formação de biofilme *in vitro* tem sido estudada utilizando diferentes metodologias, sendo os ensaios em microplacas (tal como utilizado no presente estudo) uma das mais utilizadas (Rodrigues *et al.*, 2009). A escolha do período de incubação foi de 48 h a 25°C e de 12 dias a 4°C, uma vez que se observou, no ensaio anterior, que os períodos de incubação mencionados foram suficientes para os microrganismos atingirem a fase estacionária. O desenvolvimento de biofilme foi analisado em culturas puras e culturas polimicrobianas.

Na Figura 3.2. estão representados os resultados obtidos para a avaliação da capacidade de formação de biofilme por parte das culturas puras, usando como superfícies o poliestireno e o aço inoxidável. Comparando os resultados relativamente à formação de biofilme, quer a 4°C quer a 25°C, foi possível verificar a sua formação em ambas as superfícies.

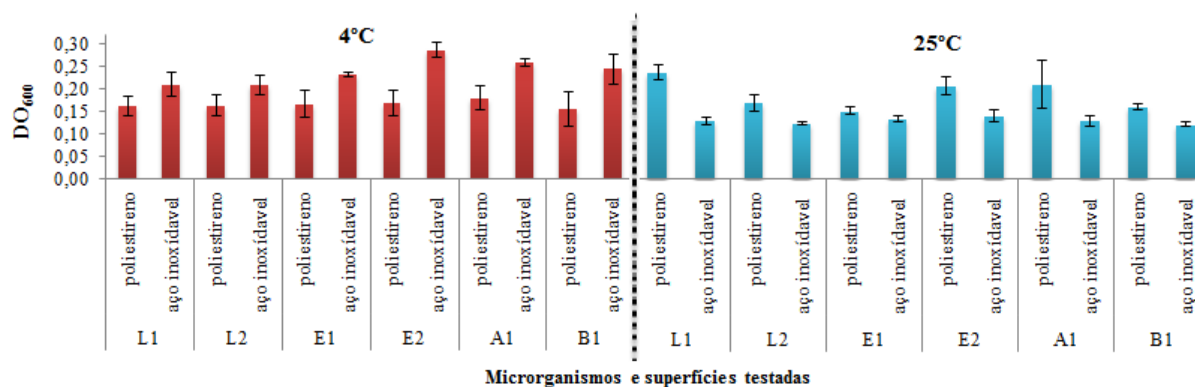


Figura 3.2. Capacidade de formação de biofilme a 4 e 25°C (culturas puras).

L1 – *L. monocytogenes* CECT 937; L2 – *L. monocytogenes* CECT 935; E1 – *E. faecalis* QSE123; E2 – *E. faecalis* V583; A1 – *A. hydrophila* A259; B1 – *B. thermosphacta* ATCC 11509^T. O ensaio decorreu em duas superfícies distintas (poliestireno e aço inoxidável), durante 12 dias a 4°C e 48h a 25°C. As barras representam as médias das quatro réplicas, com os respetivos desvios padrão.

Após o ensaio a 4°C (Figura 3.2.), temperatura de refrigeração, pode concluir-se que o aço inoxidável, proporcionou melhor formação de biofilme do que o poliestireno. Comparando os valores obtidos, observou-se que os isolados E2, A1 e B1 formaram maior quantidade de biofilme, registando-se um desenvolvimento semelhante entre os isolados L1 e L2. No caso da formação de biofilme em poliestireno, todos os isolados tiveram um comportamento relativamente semelhante, sendo o menor valor o obtido para o isolado B1.

À temperatura de 25°C, temperatura ótima de crescimento dos microrganismos em estudo, o objetivo foi igualmente o de testar o desenvolvimento de biofilme pelos diferentes microrganismos em superfícies distintas. Através dos resultados obtidos, observou-se que o poliestireno proporcionou uma formação de biofilme mais eficiente do que o aço inoxidável. Considerando os resultados para o poliestireno, os isolados L1, E2 e A1, apresentaram uma maior capacidade de formação de biofilme. Relativamente ao aço inoxidável, os seis isolados em análise demonstraram uma capacidade de formação de biofilme semelhante entre si.

Após a análise estatística (two-ways ANOVA) que teve como objetivo comparar e perceber a interação e significância dos três fatores [temperatura, superfície de formação e microrganismo (cultura pura)] foram tiradas as seguintes conclusões: tendo em conta a comparação quer entre o fator microrganismos e o fator temperatura foram detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). No entanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as superfícies. Ou seja, pode pressupor-se que ter o poliestireno ou o aço inoxidável é indiferente como superfície de crescimento de biofilme para microrganismos e condições testadas. Relativamente à interação entre os três fatores, a análise estatística detetou diferenças significativas entre estes, o que pode significar que a capacidade de formação de biofilme vai depender da conjugação da temperatura, dos microrganismos presentes e da superfície em questão.

Na Figuras 3.3, estão representados os valores obtidos para a formação de biofilme por culturas mistas, usando como superfícies o poliestireno e o aço inoxidável. Analisando os resultados a 4 e 25°C, foi possível verificar a formação de biofilme em ambas as superfícies.

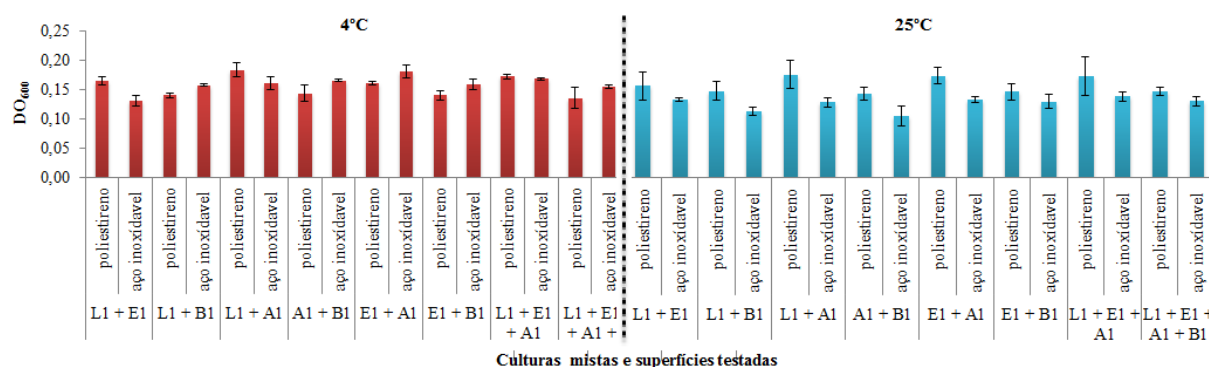


Figura 3.3. Capacidade de formação de biofilme a 4 e 25°C (culturas mistas).

L1 – *L. monocytogenes* CECT 937; L2 – *L. monocytogenes* CECT 935; E1 – *E. faecalis* QSE123; E2 – *E. faecalis* V583; A1 – *A. hydrophila* A259; B1 – *B. thermosphacta* ATCC 11509^T. O ensaio decorreu em duas superfícies distintas (poliestireno e aço inoxidável), durante 12 dias a 4°C e 48 h a 25°C. As barras representam as médias das quatro réplicas, com os respetivos desvios padrão.

No ensaio a 4°C de incubação (Figura 3.3.), através dos resultados obtidos concluiu-se que a formação de biofilme pela combinação microbiana L1+A1 foi superior em poliestireno, sendo que para combinação L1+E1+A1+B1 foram obtidos valores inferiores. Já para a combinação E1+A1 a capacidade de formação de biofilme foi mais eficiente em superfície de aço **inoxidável, sendo nas restantes combinações os valores obtidos foram semelhante entre si, à exceção de L1+E1.** Contudo, verificou-se ainda, quer à superfície de poliestireno quer de aço inoxidável, a capacidade de formação de biofilme em combinação L1+E1+A1 foi muito idêntica.

Após incubação a 25°C, através dos resultados obtidos, pode concluir-se que a formação de biofilme é mais eficiente tendo como superfície de desenvolvimento o poliestireno do que o aço inoxidável. Tendo o poliestireno como superfície de contacto, as combinações de cultura mista, como L1+A1, E1+A1 e L1+E1+A1, apresentaram valores mais elevados do que as restantes combinações.

No caso do aço inoxidável, em quase todas as combinações testadas a formação de biofilme foi equivalente, sendo que para as duas combinações L1+B1 e A1+B1 foram obtidos resultados inferiores.

Foi realizada análise estatística com igual objetivo mas usando resultados obtidos da capacidade de formação de biofilme pelas culturas mistas. Comparando cada um dos três fatores entre si, foram detetadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). Analisando a interação entre estes o resultado foi contrário ($p > 0,05$). Contudo, foi ainda demonstrado que a interação entre combinações entre microrganismos e superfície e entre temperatura e superfície, apresentam diferenças estatisticamente significativas. Possivelmente, pode afirmar-se que a superfície tem um papel importante na capacidade de biofilme formado, visto que a sua interação quer com a temperatura quer com culturas mistas de microrganismos foram significativas.

Em conclusão, analisando as Figuras 3.2. e 3.3, a superfície que melhor propiciou a formação de biofilme à temperatura de 25°C foi o poliestireno, quer em cultura pura quer em cultura mista. Pode pressupor-se que em ambientes em que a temperatura é cerca de 25°C deverá ser evitada esse tipo de superfície. Analisando os resultados à temperatura de 4°C, deverão ser efetuados mais ensaios de modo a ser possível determinar, com maior evidência qual a superfície mais propícia para a formação de biofilme.

Assim, após análise dos resultados obtidos, confirmou-se que houve capacidade de formação de biofilme, quer pelos microrganismos em cultura pura quer em culturas mistas, independentemente da temperatura de incubação ou das superfícies analisadas. Estes resultados apontam a importância do controlo que deve ser feito na indústria alimentar, quer ao nível das variações de temperatura, quer na escolha da superfície a utilizar durante o processamento e armazenamento dos alimentos. Deve haver um maior cuidado não só na escolha dos materiais, como também, na realização de limpezas regulares das superfícies que estão em contacto direto com os alimentos e que permitirão controlar ou até evitar a formação de biofilmes (Simões *et al.*, 2010).

Embora os resultados obtidos neste trabalho não possam ser diretamente comparados existem estudos analisados que demonstraram a capacidade de formação de biofilme por isolados pertencentes aos géneros bacterianos em análise. Por exemplo, Boari *et al.*, (2009) analisaram a formação de biofilme em aço inoxidável de *A. hydrophila* e *S. aureus* individualmente e em combinação, a três temperaturas 4, 7 e 18°C. A espécie *A. hydrophila*, tanto em cultura pura como na presença de *S. aureus*, formou biofilme em todas as condições pesquisadas e foi a que apresentou melhor capacidade de formar biofilme nas três temperaturas, ao contrário da espécie *S. aureus*, que só formou biofilme a 18 e a 7°C, sendo que a 4°C foi observado apenas um processo de adesão. Tal como verificado no nosso trabalho, *A. hydrophila* (A1) foi um dos três isolados que apresentou melhor capacidade de formação de biofilme tendo como superfície o aço inoxidável. Em 2015, Craveiro *et al.*, analisaram a capacidade de formação de biofilme por *Aeromonas* spp. em discos de aço inoxidável a 4 e 20°C, durante 48 h, e os resultados mostraram que os isolados pertencentes às espécies *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila* e *Aeromonas sobria*, apresentaram capacidade de formação de biofilme, sem que se tenham observado diferenças estatisticamente significativas entre espécies ou temperaturas de incubação. Em 2011, Lourenço *et al.*, avaliaram e verificaram a capacidade de formação de biofilme em tampas em espigão de poliestireno de vários isolados de *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa* (PAO1), incubadas a 37°C durante 24 h. Poimenidou *et al.*, (2016) verificaram que, quer em superfície de poliestireno quer em aço inoxidável, após 72 h de incubação à 20°C, *L. monocytogenes* formou biofilme. No entanto, foi constatado que a quantidade de biofilme formado em poliestireno foi superior em comparação com o aço inoxidável. Em 2007, Lleo *et al.* tiveram como objetivo avaliar a capacidade da formação de biofilme de diferentes espécies pertencentes ao género *Enterococcus*. O

poliestireno no fundo dos poços das microplacas serviu de superfície de crescimento e as microplacas foram incubadas a 37°C durante 48 h. Para as espécies *E. faecalis*, *E. hirae*, *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* foi verificada a capacidade de formação de biofilme, ao contrário de *E. faecium*. Em 2015, Fernandes *et al.*, avaliaram a formação de biofilmes dos isolados de *E. faecalis* e *E. faecium* em aço inoxidável variando a temperatura (7, 25, 39°C) e o tempo de incubação (0, 1, 2, 4, 6 e 8 dias). Foi verificado que à medida que a temperatura de incubação aumentou a capacidade de formação biofilme pelos microrganismos foi igualmente aumentando.

Tal como foi verificado, pelos diferentes investigadores, as duas superfícies (poliestireno e aço inoxidável) são propícias na formação de biofilme, contudo a temperatura e o tipo de microrganismos presentes têm que se ter em conta. Assim, mais uma vez, a escolha do material é um dos passos mais importantes de forma a minimizar as contaminações futuras e diminuir o impacto económico.

3.3 Avaliação da ação antimicrobiana e sinérgica de óleos essenciais e nisina sobre células planctónicas

Nos últimos anos tem sido registado um aumento do número de microrganismos resistentes ou até multirresistentes aos antibióticos. Surge assim a necessidade de pesquisa de compostos naturais alternativos com ação antimicrobiana, por exemplo de origem vegetal ou microbiana.

Para o presente trabalho, foram escolhidos dois óleos essenciais e uma bacteriocina. O OE_{tomilho} e OE_{erva-príncipe} foram selecionados na sequência do trabalho realizado por Quendera (2014). De entre os 11 OEs analisados pela autora, estes dois foram os que apresentaram superior atividade antimicrobiana sobre *E. faecalis* e *A. hydrophila*. Por sua vez, a nisina foi escolhida para este estudo, porque atualmente é a única bacteriocina aceite como conservante de alimentos em mais de 50 países, apresentando atividade antimicrobiana contra diferentes microrganismos (Ramu *et al.*, 2015).

Neste trabalho, foi então avaliada a sensibilidade de diferentes microrganismos a dois OEs e à nisina, através de dois métodos comuns e universalmente aceites: a difusão em meio sólido e a microdiluição, de acordo com as normas instituídas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2014). Essa avaliação teve o propósito de estudar a eficiência antimicrobiana desses compostos sobre os microrganismos selecionados, e futuramente avaliar a sua potencial aplicação na indústria alimentar, por exemplo, como aditivos contribuindo para o prolongamento da vida útil do alimento e/ou atuando na prevenção da formação de biofilme em ambientes industriais.

O método de difusão em meio sólido é um método qualitativo, simples, rápido, que não requer grandes quantidades de compostos antimicrobianos e os resultados são facilmente analisados pela medição de halos de inibição. No entanto, há que ter em conta que este método apresenta algumas desvantagens, como, por exemplo, devido à composição volátil dos OEs (uma vez que estes podem evaporar rapidamente) as zonas de inibição podem ser reduzidas. Para além disso, pode existir maior sensibilidade às variações de pH do meio e a difusão dos compostos antimicrobianos na placa pode não ser uniforme (Hood *et al.*, 2003). Independentemente das limitações, este método é extremamente útil para aplicação em ensaios preliminares.

Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos em análise, foi escolhida como temperatura de incubação 25°C (temperatura ambiente) e os resultados obtidos pelo método da difusão em meio sólido estão apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Atividade antimicrobiana dos compostos pelo método da difusão em meio sólido.

Compostos antimicrobianos	Microrganismos testados (diâmetro de halos de inibição em mm)					
	L1	L2	E1	E2	A1	B1
OE _{tomilho}	5,5 ± 0,4	5,2 ± 0,2	5,5 ± 0,5	5,0 ± 0,0	6,2 ± 0,2	5,7 ± 0,5
OE _{erva-príncipe}	5,0 ± 0,4	4,8 ± 0,6	Ø	Ø	4,0 ± 0,4	Ø
Nisina	7,3 ± 0,6	10,3 ± 2,9	8,3 ± 1,5	7,2 ± 1,6	7,0 ± 0,0	23 ± 0,0

Cada valor representa a média do diâmetro de halos de inibição em milímetros (três réplicas) ± desvio-padrão. Ø – não foram obtidos halos de inibição.

L1 – *L. monocytogenes* CECT 937; L2 – *L. monocytogenes* CECT 935; E1 – *E. faecalis* QSE123; E2 – *E. faecalis* V583; A1 – *A. hydrophila* A259; B1 – *B. thermosphacta* ATCC 11509^T.

No ensaio de difusão em meio sólido, foi possível medir as zonas de inibição para a maioria dos compostos antimicrobianos em análise. A exceção foi para o OE_{erva-príncipe} que não originou qualquer efeito inibitório sobre E1, E2 e B1, provavelmente devido a composição volátil do OE que levou a evaporação ou não houve uma distribuição uniforme do mesmo.

Comparando o efeito dos dois OEs, verificou-se que o OE_{tomilho} demonstrou capacidade inibitória superior ao OE_{erva-príncipe}. Por exemplo, no caso do isolado A1, foi obtida uma zona de inibição de 6,2 mm para o OE_{tomilho}, enquanto que, com o OE_{erva-príncipe} foi de 4,0 mm.

No caso da nisina, registou-se um maior efeito antimicrobiano sobre o isolado B1, tendo uma zona de inibição de 23 mm.

O método da microdiluição (utilizando microplacas de 96 poços) é um método quantitativo, eficiente e sensível, que permite utilizar volumes pequenos de compostos antimicrobianos. A atividade antimicrobiana é obtida pela determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima bactericida (CMB). No entanto, este método também pode apresentar desvantagens devido à natureza hidrofóbica dos OEs, sendo por isso necessário utilizar um solvente (como por exemplo, tween, DMSO- dimetilsulfóxido, etanol) que, durante a experiência, assegure o contacto entre o composto e o microrganismo (Hood *et al.*, 2003).

Na Tabela 3.3 estão representadas as CMIs e CMBs obtidas para cada composto antimicrobiano e microrganismo testado em cultura pura.

Tabela 3.3. Concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida dos compostos antimicrobianos sobre os microrganismos testados (culturas puras).

Microrganismos	OE _{tomilho}		OE _{erva-príncipe}		Nisina	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
L1 - <i>L. monocytogenes</i> CECT 937	0,24	0,49	0,49	0,98	25,00	50,00
L2 - <i>L. monocytogenes</i> CECT 935	0,24	0,49	7,80	15,60	25,00	50,00
E1 - <i>E. faecalis</i> QSE123	0,24	0,49	1,95	3,90	12,50	50,00
E2 - <i>E. faecalis</i> V583	0,24	0,97	0,98	1,95	12,50	50,00
A1 - <i>A. hydrophila</i> A259	0,06	0,12	>15,60	>15,60	12,50	25,00
B1 - <i>B. thermosphacta</i> ATCC 11509 ^T	0,24	0,97	0,98	1,95	12,50	50,00

CMI - concentração mínima inibitória. CMB - concentração mínima bactericida. Os valores das concentrações estão representados em µg/µL para os OEs e UI/µL para a nisina. Foram usadas as concentrações iniciais de 15,55 µg/µL para o OE_{tomilho}, 15,60 µg/µL para OE_{erva-príncipe} e 100 UI/µL de nisina. CMI >15,60 µg/µL corresponde ao crescimento em toda a gama de concentrações testadas.

No geral, de acordo com os resultados obtidos verifica-se que para os três compostos naturais, de origem vegetal e microbiana, foi possível determinar as concentrações mínimas inibitórias e bactericidas. Todavia, houve uma exceção, uma vez que não foi possível obter resultados da atividade

antimicrobiana de OE_{erva-príncipe} para A1, possivelmente devido à falta de sensibilidade do isolado à ação do OE.

Comparando os dois OEs observou-se que OE_{tomilho} teve um efeito inibitório mais eficaz que OE_{erva-príncipe}, sendo necessárias concentrações inferiores (0,06 - 0,24 µg/µL). No caso de OE_{tomilho} foram obtidas CMI's iguais para os isolados pertencentes ao gênero *Listeria* (L1, L2), *Enterococcus* (E1 e B2) e *Brochothrix* (B1) (0,24 µg/µL). Relativamente ao isolado A1, foi possível obter inibição apenas com 0,06 µg/µL de composto antimicrobiano. Para OE_{erva-príncipe}, as CMI's variaram entre 0,49 – 7,80 µg/µL, tendo o menor valor sido registado para o isolado L1, com uma CMI de 0,49 µg/µL.

Estudos anteriores relataram que as bactérias Gram-positivas são mais sensíveis à ação dos OEs do que as Gram-negativas, uma vez que a resistência dos microrganismos a estes compostos está relacionada com a constituição da parede celular (Prabuseenivasan *et al.*, 2006). No entanto existem exceções e alguns OEs são capazes de penetrar em diferentes tipos de células microbianas e causar danos (Prabuseenivasan *et al.*, 2006). Tal foi verificado neste trabalho, através dos resultados obtidos com o isolado A1 (Gram-negativo) que demonstrou maior sensibilidade ao OE_{tomilho} sendo necessários apenas 0,06 µg/µL para que houvesse um efeito inibitório no crescimento, enquanto, para OE_{erva-príncipe} esse facto não foi verificado. Pode dizer-se que existe um conjunto de características que influenciam o efeito antimicrobiano do OE como: os seus constituintes principais e/ou constituintes minoritários, mas também poderá depender de outros fatores como: a temperatura, o tempo de incubação ou a concentração celular (Seow *et al.*, 2014).

No caso da nisina, foi possível determinar as CMI's para todos os isolados estudados (12,50 – 25,00 UI/µL), tendo-se observado a CMI mais elevada (25,00 UI/µL) para os isolados pertencentes ao gênero *Listeria*. Muitas bacteriocinas são eficazes contra bactérias patogénicas Gram-positivas e o efeito da nisina em *L. monocytogenes*, é descrito por vários autores (Chen *et al.*, 2014; Miyamoto *et al.*, 2015). Contudo, no trabalho presente, para os dois isolados pertencentes ao gênero *Listeria* foram necessárias concentrações mais elevadas do composto em comparação com as restantes bactérias Gram-positivas. Relativamente aos estudos realizados por Chen *et al.* (2014) e Oladunjoye *et al.* (2016), foram determinadas CMI's apenas de 0,3125 UI/µL e de 5 UI/µL de nisina, respetivamente. Comparando os resultados destes autores com a CMI obtida no presente trabalho foi verificada uma diferença significativa entre concentrações. Futuramente, deverão ser realizados mais ensaios de forma a compreender melhor o efeito inibitório da nisina relativamente aos isolados, já que poderá ser um fator preocupante, visto que a nisina é a única bacteriocina aprovado como conservante alimentar.

Em relação à determinação das CMBs, constatou-se que os três compostos em estudo apresentam efeito bactericida. Para OE_{tomilho} os valores variaram entre 0,12-0,97 µg/µL; para OE_{erva-príncipe} entre 0,98-15,60 µg/µL e para a nisina entre 25,00-50,00 UI/µL. De acordo com os resultados, pode pressupor-se que possivelmente o OE com maior ação bacteriocina será o OE_{tomilho}.

Os resultados apresentados na Tabela 3.4. foram obtidos após análise da atividade antimicrobiana, na gama de concentrações anteriormente testadas, mas utilizando culturas mistas de microrganismos. Os ensaios realizados com as culturas mistas tiveram como objetivo aproximar as experiências realizadas em laboratório ao que sucede *in vivo*. Os microrganismos normalmente não se encontram separados, vivem em comunidades, havendo competição pelos nutrientes ou, cooperando uns com os outros pela sobrevivência em condições adversas.

Tabela 3.4. Concentração mínima inibitória e concentração mínima bactericida dos compostos antimicrobianos sobre combinações microbianas (culturas mistas).

Culturas Mistas	OE _{tomilho}		OE _{erva-príncipe}		Nisina	
	CMI	CMB	CMI	CMB	CMI	CMB
L1+E1	0,97	1,94	1,95	3,90	25,00	50,00
L1+B1	0,12	0,97	0,49	1,95	12,50	50,00
L1+A1	0,49	0,97	0,98	1,95	12,50	50,00
A1+B1	0,49	0,97	0,98	1,95	12,50	50,00
E1+ A1	0,49	0,97	1,95	3,90	12,50	50,00
E1+B1	0,24	0,97	1,95	3,90	12,50	50,00
L1+E1+A1	0,97	1,94	1,95	3,90	12,50	50,00
L1+E1+A1+B1	0,49	1,94	0,98	3,90	12,50	50,00

CMI - concentração mínima inibitória. CMB - concentração mínima bactericida. Os valores das concentrações estão representados em µg/µL para os OEs e UI/µL para a nisina. Foram usadas as concentrações iniciais de 15,55 µg/µL para o OE_{tomilho}, 15,60 µg/µL para OE_{erva-príncipe} e 100 UI/µL de nisina.

L1 – *L. monocytogenes* CECT 937; L2 – *L. monocytogenes* CECT 935; E1 – *E. faecalis* QSE123; E2 – *E. faecalis* V583; A1 – *A. hydrophila* A259; B1 – *B. thermosphacta* ATCC 11509^T

Comparando os dois OEs, tal como observado no ensaio anterior, OE_{tomilho} foi mais eficiente, sendo necessárias concentrações mais reduzidas 0,12 – 0,97 µg/µL para que houvesse inibição do crescimento bacteriano. No caso de OE_{erva-príncipe}, a gama de CMIs variou entre 0,49 – 1,95 µg/µL.

Analisando as respostas das diferentes combinações, para L1+B1 foram necessárias concentrações inferiores relativamente às restantes, OE_{tomilho} com CMI=0,12 µg/µL e OE_{erva-príncipe} com CMI=0,49 µg/µL. Estes resultados foram bastante semelhantes aos valores de CMIs em cultura pura para L1 e B1 (Tabela 3.3). No caso do OE_{tomilho}, para os isolados L1 e B1 obtiveram-se CMIs de 0,24 µg/µL e quando em cultura mista o OE mostra maior eficácia, sendo necessárias apenas 0,12 µg/µL para que houvesse uma inibição do crescimento bacteriano. No caso de OE_{erva-príncipe}, também foi observada uma situação semelhante. Com estes resultados pode afirmar-se que os valores obtidos para a concentração inibitória dos OEs são bastante semelhantes, quer para culturas puras quer para culturas mistas. O facto de não ser necessário concentrações mais altas dos OEs para as culturas mistas poderá corresponder a uma vantagem na sua utilização, uma vez que os microrganismos vivem em comunidades e não em cultura pura.

No caso da nisina, os valores das CMIs foram iguais para todas as combinações de culturas mistas (12,50 UI/µL), com a exceção da combinação L1+E1 em que se obteve um valor de CMI superior, 25,00 UI/µL. Comparando as CMIs quer em cultura pura quer em cultura mista foram muito idênticas.

Em relação à determinação de CMBs, o efeito do OE_{tomilho} variou entre 0,97-1,94 µg/µL, e no caso do OE_{erva-príncipe} entre 1,95-3,90 µg/µL. Para a nisina o efeito bactericida foi equivalente em todas as combinações bacterianas (50,00 UI/µL).

No geral, ao comparar os dados obtidos entre culturas puras e mistas de microrganismos, constatou-se que OE_{tomilho} demonstrou maior potencial antimicrobiano do que OE_{erva-príncipe}. Entre estes dois OEs, OE_{tomilho} poderá ser indicado como uma alternativa na prevenção do crescimento microbiano, mas será igualmente necessário realizar estudos adicionais.

A atividade antimicrobiana de OEs e nisina tem sido avaliada por vários investigadores (Ahmad e Viljoen, 2015; Bassolé e Juliani, 2012; Burt, 2004; Chen *et al.*, 2014; Dosler e Gerceker,

2012; Gálvez *et al.*, 2007; He *et al.*, 2016, entre outros). No entanto, não é possível uma comparação direta com os resultados publicados, visto que existe um conjunto de fatores, tais como, as propriedades do meio de cultura, a escolha do método aplicado e das espécies dos microrganismos em análise, que podem influenciar os dados obtidos. Outros fatores como a temperatura, o tempo de incubação ou mesmo a concentração e a quantidade do inóculo e/ou do composto antimicrobiano também têm uma grande importância (Olasupo *et al.*, 2003; Seow *et al.*, 2014). Os trabalhos abaixo mencionados permitiram comprovar a eficácia dos compostos antimicrobianos analisados no presente estudo.

Ballester-Costa *et al.* (2013) demonstraram a atividade antimicrobiana de OE_{tomilho} (*T. vulgaris*), sobre 10 microrganismos distintos, inclusive *A. hydrophila*, usando o método de difusão em disco para avaliação da inibição e o método da microdiluição para determinar as CMI. Os resultados obtidos foram os seguintes: o OE_{tomilho} apresentou halo de inibição de 10,75 mm (o diâmetro do disco 9 mm) e CMI de 3,75 µL/mL. No mesmo ano Miladi *et al.*, determinaram a atividade do OE_{tomilho} e de rosmarinho em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, estando incluídas *L. monocytogenes* e *E. faecalis*. Pelo método de difusão em disco, obteve-se uma zona de inibição cerca de 44 mm (diâmetro do disco 6 mm) para *L. monocytogenes* e 27,33 mm, para *E. faecalis*. Em 2012, Nowak *et al.*, demonstraram o efeito inibitório de OE_{tomilho} sobre *B. thermosphacta* (CMI =0,05%). Em todos os estudos foi verificada e confirmada a eficiência do OE_{tomilho} na inibição do crescimento microbiano.

A atividade antimicrobiana do OE_{erva-príncipe} (*C. flexuosus*) não tem sido muito investigada, e por essa razão os estudos anteriormente realizados referem-se frequentemente a outra espécie, *C. citratus*. Em 2012, Oliveira *et al.*, averiguaram o efeito antimicrobiano do OE_{erva-príncipe} (*C. flexuosus*) sobre *L. monocytogenes* através do método de difusão em disco e microdiluição, sendo observado uma halo de inibição de 17,15 mm de (diâmetro do disco 6 mm) e determinada CMI de 0,12% (v/v). Em 2015, Starliper *et al.*, testaram a atividade antimicrobiana de *C. citratus* e *C. flexuosus* em *Aeromonas* spp. Não foi possível a determinação de halos de inibição para *C. flexuosus*, todavia, para *C. citratus* foi medida uma zona de inibição de 44,7 mm (diâmetro do disco 6 mm). Estes autores demonstraram ainda o efeito bactericida de *C. citratus* e *C. flexuosus* sobre *Aeromonas* spp. (concentrações de 0,36% e 0,65%, respetivamente). No mesmo ano, outros dois investigadores Ahmad e Viljoen, estudaram o efeito inibitório de OE_{erva-príncipe} (*C. flexuosus*) em vários microrganismos incluindo *E. faecalis*, para o qual foi obtida CMI de 0,250 mg/mL. Não foi possível encontrar qualquer estudo relativo ao efeito do OE_{erva-príncipe} sobre *Brochothrix*.

Relativamente à atividade antimicrobiana da nisina foram já efetuados vários estudos. Em 2013, Ballester-Costa e colaboradores demonstraram o efeito da nisina sobre *A. hydrophila*, determinando a CMI de 2,50 µL/mL. Em 2014, Chen *et al.*, determinaram o efeito inibitório e bactericida da nisina em *L. monocytogenes* (CMI 312,5 IU/mL e CMB 1250 IU/mL). Dosler e Gerceker (2013), testaram CMI para 15 isolados de *E. faecalis*, a sua eficácia foi variando de isolado para isolado e as CMIs estavam entre 4-32 µg/mL. Recentemente, He *et al.* (2016), analisaram o efeito antimicrobiano da nisina em nove microrganismos que incluíam *B. thermosphacta* e *L. monocytogenes*, para os quais foram determinadas CMIs de 2,44 mg/L e de 1,65 mg/L, respetivamente.

Estes estudos sustentam a ideia de que os compostos antimicrobianos poderão vir a ser uma alternativa no controlo do crescimento microbiano. Futuramente, a fim de conjugar as melhores condições da atividade antimicrobiana *in vitro*, poder-se-á avançar e confirmar a eficiência dos OEs a nível industrial, testando em produtos alimentícios. Para além da nisina, os OEs poderão vir a

contribuir para o aumento das opções de compostos antimicrobianos a serem utilizados na indústria alimentar como conservantes naturais.

Após análise da atividade antimicrobiana dos três compostos naturais sobre culturas microbianas puras e mistas, foi ainda testado o efeito dos compostos quando em combinação. Estudos anteriores revelaram que, além de ser possível testar vários compostos ao mesmo tempo (utilizando quantidades inferiores de cada um), pode-se contribuir para potenciar a atividade antimicrobiana devido ao efeito sinérgico que pode ocorrer entre compostos distintos (Bassolé e Juliani, 2012; Hyldgaard *et al.*, 2012; Olasupo *et al.*, 2003).

A combinação entre diferentes compostos poderá resultar numa possível interação, existindo três efeitos que podem ser destacados: o sinergismo é verificado quando a atividade dos compostos combinados é superior à soma das atividades individuais; o efeito aditivo ocorre quando o efeito combinado dos componentes é igual à soma dos efeitos individuais; em contraste, o efeito antagónico é associado a atividade dos componentes que em combinação é inferior à de quando são usados separadamente (Faleiro, 2011).

O efeito sinérgico entre OEs e outros agentes antimicrobianos é uma das novas estratégias para inibir microrganismos resistentes a uma vasta gama de antibióticos (Padalia *et al.*, 2015). Neste estudo, foram preparadas quatro combinações distintas com o objetivo de determinar as CMIs para cada combinação e, de seguida, calcular a concentração inibitória fracionada (CIF) e o índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) (Tabela 3.5), de forma a verificar se existe efeito sinérgico (ou outro) entre os compostos antimicrobianos em análise.

Tabela 3.5. Determinação do efeito sinérgico entre compostos antimicrobianos.

Microrganismos	CMI _c			CMI _i			CIF			ICIF	
	OE _{tomilho}	OE _{erva-príncipe}	Nisina	OE _{tomilho}	OE _{erva-príncipe}	Nisina	OE _{tomilho}	OE _{erva-príncipe}	Nisina		
L1 - <i>L. monocytogenes</i> CECT 937	0,58	0,14	1,04	0,24	0,49	25	2,42	0,29	0,04	I	2,74
	7,08	1,73		0,24	0,49		29,5	3,53		II	33,03
	0,88		1,56	0,24		25	3,67	0,06		III	3,73
		1,73	12,5		0,49	25		3,53	0,5	IV	4,03
L2 - <i>L. monocytogenes</i> CECT 935	0,07	0,02	0,13	0,24	7,8	25	0,29	0	0,01	I	0,30
	0,06	0,01		0,24	7,8		0,25	0		II	0,25
	0,03		0,05	0,24		25	0,13		0	III	0,13
		1,73	12,5		7,8	25		0,22	0,5	IV	0,72
E1 - <i>E. faecalis</i> QSE123	0,29	0,07	0,52	0,24	1,95	12,5	1,21	0,04	0,04	I	1,29
	0,22	0,05		0,24	1,95		0,92	0,03		II	0,95
	0,22		0,39	0,24		12,5	0,92		0,03	III	0,95
		1,73	12,5		1,95	12,5		0,89	1	IV	1,89
E2 - <i>E. faecalis</i> V583	0,29	0,07	0,52	0,24	0,98	12,5	1,21	0,07	0,04	I	1,32
	0,22	0,05		0,24	0,98		0,92	0,05		II	0,97
	0,11		0,2	0,24		12,5	0,46		0,02	III	0,49
		1,73	12,5		0,98	12,5		1,77	1	IV	2,77
A1 - <i>A. hydrophila</i> A259	0,58	0,14	1,04	0,06	>15,60	12,5	9,67	ND	0,08	I	ND
	0,88	0,22		0,06	>15,60		14,67	ND		II	ND
	0,22		0,39	0,06		12,5	3,67		0,03	III	3,70
		1,73	12,5		>15,60	12,5		ND	1	IV	ND
B1 - <i>B. thermosphacta</i> ATCC 11509 ^T	0,29	0,07	0,52	0,24	0,98	25	1,21	0,07	0,02	I	1,30
	0,22	0,05		0,24	0,98		0,92	0,05		II	0,97
	0,22		0,39	0,24		25	0,92		0,02	III	0,94
		1,73	12,5		0,98	25		1,77	0,5	IV	2,27

CMI_c – concentração mínima inibitória combinada; CMI_i – concentração mínima inibitória individual; CIF – concentração inibitória fracionada; ICIF – índice concentração inibitória fracionada; Os valores estão representados em µg/µL para os OEs e UI/µL para a nisina. ND – não determinado. I a IV representam as combinações: I - OE_{tomilho} + OE_{erva-príncipe} + Nisina; II - OE_{tomilho} + OE_{erva-príncipe}; III – OE_{tomilho} + Nisina e IV - OE_{erva-príncipe} + Nisina
 cor verde – Sinergismo ICIF < 0,33; cor azul – Aditivo 0,33 ≤ ICIF ≤ 1; cor salmão – Indiferente 1 < ICIF < 3; cor vermelha-Antagônico ICIF > 3.

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 3.5.), a combinação que incluía os três compostos antimicrobianos revelou um efeito indiferente/antagônico para todos os isolados. Uma possível explicação para esse efeito deve-se ao facto de ocorrer uma interferência da nisina na estrutura e/ou na configuração dos componentes ativos dos OEs, diminuindo a sua atividade específica. Ou por exemplo, os OEs podem realmente danificar a membrana mas duma forma insuficiente para que fosse permitida a entrada de nisina. Além disso, a interferência da nisina na ação de outros antimicrobianos parece depender, não só do microrganismo alvo, mas também da natureza desses antimicrobianos (Olasupo *et al.*, 2003). Era expetável que ação da nisina e dos OEs sobre a membrana citoplasmática tivesse um efeito aditivo ou sinérgico, permitindo assim a aplicação dos três

antimicrobianos em menor quantidade sem diminuir o efeito inibitório, no entanto no presente trabalho tal não.

Realizando uma comparação entre os resultados de ICIFs (Tabela 3.5.) obtidos para cada microrganismo, dos seis isolados em estudo, um efeito sinérgico das combinações testadas foi revelado só no isolado L2, sendo a última com efeito aditivo (OE_{tomilho} + Nisina). Pode concluir-se que as combinações testadas neste isolado permitiram um efeito superior dos compostos em comparação com a forma individual.

Tendo em conta a combinação OE_{tomilho} + OE_{erva-príncipe}, observou-se um efeito sinérgico em L2. Pode significar que, possivelmente estando os dois OEs em contacto, os seus principais constituintes permitem que haja uma superior atividade antimicrobiana (Bassolé e Juliani, 2012). Sabe-se que, a sua eficácia, por vezes, não está exclusivamente ligada aos seus principais componentes ativos, mas também à interação entre estes e os componentes minoritários (por exemplo: α -pineno, linalool e α -terpineol) (Burt, 2004; Hyldgaard *et al.*, 2012). Observou-se ainda um efeito aditivo em três dos microrganismos em estudo, podendo dizer-se que a sua combinação é melhor do que tendo os compostos na forma individual, mas não é tão eficiente como foi observado pela L2.

No caso de L1, foi o único isolado para o qual se observou um efeito antagónico entre as combinações testadas. Estas relações antagónicas, tal como as de sinergismo são difíceis de explicar, na medida em que o modo de ação dos compostos antimicrobianos ainda está longe de ser totalmente conhecido (Bassolé e Juliani, 2012; Olasupo *et al.*, 2003). No entanto, futuramente deverão ser testadas as mesmas concentrações para confirmação destes resultados.

Avaliando a combinação entre OE_{tomilho} e nisina, também foi verificado o efeito sinérgico em L2 e o efeito aditivo em E1, E2 e B1. Provavelmente, a combinação com os componentes pertencentes ao OE_{tomilho} com a bacteriocina é mais eficiente do que com o OE_{erva-príncipe}, sendo a mistura entre os dois mais eficaz no efeito inibitório da célula bacteriana. Alguns estudos têm sido realizados e confirmam o efeito aquando da junção de OE_{tomilho} e os seus componentes com a nisina, com algumas bactérias (Burn, 2004). Como por exemplo, Gálvez *et al.* (2007) citaram a existência de atividade sinérgica da nisina com o carvacrol, eugenol e timol, sobre microrganismos incluindo *L. monocytogenes*.

É de salientar que no caso do isolado A1, não foi possível obter valor para o ICIF devido à ausência dos resultados de CMI individual, no ensaio anteriormente mencionado.

Nos últimos anos tem havido um interesse crescente na utilização de agentes antimicrobianos naturais. A sua combinação pode resultar numa via de controlo do desenvolvimento dos microrganismos patogénicos e deteriorativos ou prevenir o surgimento de novos microrganismos resistentes. Além disso, a grande vantagem do uso de combinações é o facto de serem necessárias menores quantidade de compostos substituindo a sua utilização na forma individual (Bassolé e Juliani, 2012). Na indústria alimentar, poder-se-á constituir um ponto de partida para uma nova forma de prevenção do crescimento de microrganismos indesejáveis, permitindo aumentar o tempo de vida útil dos alimentos. Nesse sentido, será possível impedir as consequências indesejáveis para a saúde humana e a nível económico (Bassolé e Juliani, 2012; Padalia *et al.*, 2015).

Atualmente já foram realizados vários estudos, que demonstraram a capacidade dos OEs e bacteriocinas na prevenção do crescimento e deterioração por microrganismos patogénicos nos alimentos. Tal é o caso da pesquisa empreendida em 2002 por Singh *et al.*, em que foi demonstrada a ação antimicrobiana do OE_{tomilho} sobre *E. coli* O157: H7 em cenouras bebé. Já Abdollahzadeh *et al.*

(2014) demonstraram que a combinação do OE_{tomilho} e nisina reduziu a população microbiana de *L. monocytogenes* em polpa de peixe, após 2 dias de armazenamento no frio, tendo-se depois mantido inalterada por um período de 12 dias.

3.4 Avaliação da ação antimicrobiana de óleos essenciais na erradicação de biofilmes

Hoje em dia, há uma grande necessidade de encontrar novos agentes que sejam eficazes contra a formação e na erradicação de biofilmes. Além disso, é muito importante compreender melhor o mecanismo de adesão, fixação e desenvolvimento que leva à maturação de biofilme, para entender de que forma podemos eliminá-lo mais eficazmente. A sua capacidade de formação representa uma preocupação ao nível da saúde pública, devido não só à sua potencial resistência aos tratamentos antimicrobianos, como também à sua capacidade de degradar e contaminar os alimentos. Tal deve-se ao facto de os microrganismos que formam biofilme serem resistentes às agressões externas, tornando-se difícil a sua erradicação (Jefferson, 2004; Srey *et al.*, 2013). Na realização de uma limpeza adequada, devem considerar-se quatro fatores principais de igual importância: a ação química, a ação mecânica, a temperatura e o tempo de contacto. Os compostos naturais de origem vegetal, tais como os OEs e os respetivos componentes químicos têm sido pesquisados, não só com a intenção de prevenir a formação de biofilmes, mas também com o intuito de erradicá-los (Kerekes *et al.*, 2015).

No presente estudo, foi determinada a concentração mínima de erradicação de biofilme (CMEB) para OE_{tomilho} e OE_{erva-príncipe}, sobre os microrganismos em estudo (culturas puras e mistas), através de uma adaptação da metodologia *Calgary biofilm device* descrita por Ceri *et al.*, 1999. Esta metodologia permite uma realização rápida do ensaio e obtenção de dados reprodutíveis, usando uma microplaca com tampa em espigão (Olson *et al.*, 2002). Esta tampa facilita o contacto, quer com o meio de crescimento quer com os OEs, durante a formação ou erradicação de biofilme. No entanto, pode haver dificuldade na obtenção de dados quantitativos, já que os microrganismos nem sempre têm a mesma capacidade de crescimento. Para além disso, a formação de biofilme à superfície da tampa em espigão pode ser dificultada pela reduzida área dos próprios espigões (Olson *et al.*, 2002).

Nas Tabelas 3.6. e 3.7, estão representados os resultados obtidos para OE_{tomilho} e para OE_{erva-príncipe}. Quer as culturas puras quer as culturas mistas foram incubadas durante 48 h a 25°C, o que permitiu a formação de biofilme, tendo como superfície o poliestireno da tampa em espigão. De seguida, a tampa foi colocada, durante 30 min, em OEs e deixada em contacto com estes.

Tabela 3.6. Concentrações mínimas de erradicação de biofilme dos OEs sobre os microrganismos em estudo (cultura pura).

Microrganismos	CMEB	
	OE _{tomilho}	OE _{erva-príncipe}
L1 - <i>L. monocytogenes</i> CECT 937	443,14	443,14
L2 - <i>L. monocytogenes</i> CECT 935	110,79	443,14
E1 - <i>E. faecalis</i> QSE123	221,57	> 886,28
E2 - <i>E. faecalis</i> V583	886,28	886,28
A1 - <i>A. hydrophila</i> A259	443,14	886,28
B1 - <i>B. thermosphacta</i> ATCC 11509 ^T	886,28	886,28

CMEB - concentração mínima de erradicação de biofilme. Os valores estão representados em µg/µL. CMEB >886,28 µg/µL corresponde ao crescimento em toda a gama de concentrações testadas.

Relativamente ao OE_{tomilho}, CMEB_{L2}=110,79 µg/µL e CMEB_{E1}=221,57 µg/µL foram inferiores, em comparação com os restantes isolados (CMEB foi de 443,14 e 886,28 µg/µL). No caso

do OE_{erva-príncipe} as CMEBs foram mais homogêneas, sendo CMEB_{L1} de 443,14 µg/µL e para os isolados E2, A1 e B1 de 886,28 µg/µL. Pode ser concluído que, comparando com os ensaios anteriores no estudo na atividade dos OEs, o OE_{tomilho}, mais uma vez, demonstrou uma eficácia superior relativamente ao OE_{erva-príncipe}. Não foi possível determinar a CMEB do OE_{erva-príncipe} para o isolado E1 sendo necessárias concentrações superiores, visto que foi verificado pela presença do crescimento dos isolados em placas de BHI.

De acordo com a Tabela 3.7, das oito combinações analisadas só foi possível determinar as CMEBs em quatro combinações bacterianas pelo OE_{tomilho}. Sendo para L1+B1 e A1+B1 CMEB = 443,14 µg/µL e para E1+B1 e L1+E1+A1+B1 CMEB= 886,28 µg/µL, que corresponde ao valor máximo de concentração testado. No caso do OE_{erva-príncipe}, só foi possível determinar a CMEB de 886,28 µg/µL para a combinação L1+A1.

Tabela 3.7. Concentrações mínimas de erradicação de biofilme para os OEs (culturas mistas).

Cultura Mista	CMEB	
	OE _{tomilho}	OE _{erva-príncipe}
L1 + E1	> 886,28	> 886,28
L1 + B1	443,14	> 886,28
L1 + A1	> 886,28	886,28
A1 + B1	443,14	> 886,28
E1 + A1	> 886,28	> 886,28
E1 + B1	886,28	> 886,28
L1 + E1 + A1	> 886,28	> 886,28
L1 + E1 + A1 + B1	886,28	> 886,28

CMEB - concentração mínima de erradicação de biofilme. Os valores estão representados em µg/µL. CMEB >886,28 µg/µL corresponde ao crescimento em toda a gama de concentrações testadas.

L1 – *L. monocytogenes* CECT 937; L2 – *L. monocytogenes* CECT 935; E1 – *E. faecalis* QSE123; E2 – *E. faecalis* V583; A1 – *A. hydrophila* A259; B1 – *B. thermosphacta* ATCC 11509^T

Pode concluir-se que, quando o biofilme é formado por culturas mistas, a capacidade de erradicação pelos OE_{tomilho} e OE_{erva-príncipe} é semelhante relativamente aos biofilmes formados por culturas puras mas não são tão eficazes. Este ensaio confirma uma vez mais a necessidade de apostar na prevenção do crescimento microbiano e pesquisa de concentrações eficazes dos OEs, evitando que os microrganismos formem biofilmes, porque uma vez formados, a sua eliminação é extremamente complicada. Especialmente se considerarmos que, na indústria alimentar os microrganismos, normalmente, não estão isolados, mas sim em comunidades polimicrobianas.

Estes resultados podem ser justificados pelo facto de que uma formação de biofilme por culturas mistas de microrganismos é mais estável do que quando o biofilme é formado apenas por um tipo de microrganismo (Oliveira *et al.*, 2012). A erradicação de biofilmes é muito difícil, uma vez que as células sésseis estão protegidas pela matriz e como consequência são mais resistentes às agressões externas, em particular, à entrada de agentes antimicrobianos. Assim, o objetivo não tem de ser necessariamente inibir o crescimento microbiano, mas, sim, penetrar na estrutura do biofilme (Jefferson 2004; O'Toole *et al.*, 2000; Simões *et al.*, 2010).

Atualmente, a pesquisa de compostos novos e eficazes contra os biofilmes é de grande interesse. Os OEs poderão ser uma das soluções tanto no controlo do crescimento microbiano como na sua contaminação e consequentemente na formação de biofilmes, no enquanto são necessários mais ensaios que permitirão determinar as concentrações necessárias para o seu efeito. Até hoje, vários autores demonstraram a capacidade de erradicação de biofilme pelo OE_{tomilho} em microrganismos

como: *Pseudomonas*, *S. aureus*, *Salmonella* e *S. epidermidis* (Kavanaugh e Ribbeck 2012; Miladi *et al.*, 2016; Nostro *et al.*, 2007). Em 2012, Adukwu *et al.*, verificaram que OE_{erva-príncipe} foi incapaz de erradicar o biofilme, mas foi obtida inibição da formação de biofilme por *S. aureus* pela ação do mesmo OE.

Fazendo uma comparação dos resultados obtidos para as CMIs na forma planctónica (Tabela 3.3.) e os resultados obtidos para as CMEBs (Tabela 3.6.) usando a atividade dos OEs, observou-se o seguinte: quando os microrganismos estão na forma séssil (biofilme) são necessárias concentrações de OEs muito superiores para a sua erradicação do que para eliminar as células bacterianas na sua forma planctónica. Por exemplo, no caso dos isolados L1 e B1, foram necessárias concentrações aproximadamente 1500 vezes superiores às concentrações necessárias para inibir o crescimento das células planctónicas. O mesmo sucedeu para o isolado L1, em que CMI_{OEtomilho} foi de 0,24 µg/µL e a CMI_{OEerva-príncipe} foi de 0,49 µg/µL, no entanto, foram necessários 443,14 µg/µL de cada OE para erradicar o biofilme formado no poliestireno. No caso do biofilme formado por culturas mistas foi igualmente verificada a necessidade de utilizar concentrações muito elevadas.

Em resumo, estes resultados devem ser tidos em consideração ao nível das indústrias alimentares nos processos de controlo, tais como a implementação de um programa efetivo de limpeza e saneamento, para inativar os microrganismos e prevenir a acumulação de biofilmes nas superfícies e equipamentos (Oliveira *et al.*, 2010; Srey *et al.*, 2013).

4. Conclusões

O presente estudo teve como principal objetivo a avaliação da atividade antimicrobiana de dois OEs e de uma bacteriocina sobre bactérias patogénicas e deteriorativas comumente presentes nos alimentos, nomeadamente *E. faecalis*, *L. monocytogenes*, *A. hydrophila* e *B. thermosphacta*. O efeito antimicrobiano destes compostos (isolados ou em combinação) foi avaliado sobre as células bacterianas na sua forma planctónica e também no estado de biofilme, avaliando culturas puras e mistas.

- ✓ Inicialmente foi analisada a capacidade de crescimento dos microrganismos, tendo-se observado que a temperaturas mais baixas, a taxa de crescimento microbiano foi reduzida, sendo o aumento da taxa de crescimento microbiano diretamente proporcional ao aumento da temperatura. Com este ensaio, confirmou-se que o controlo da temperatura é um o fator crucial no desenvolvimento e crescimento microbiano.
- ✓ De seguida foi analisada a capacidade de formação de biofilme em duas superfícies distintas, poliestireno e aço inoxidável, a diferentes temperaturas. Observou-se que ambas as superfícies foram propícias ao crescimento microbiano, quer por parte de culturas puras, quer de culturas mistas. Deverá existir uma especial atenção e cuidado na escolha do material que vai servir de superfície de contacto e de processamento, nas indústrias alimentares.
- ✓ No estudo da ação antimicrobiana dos OEs e da nisina (tanto individualmente como em combinação) sobre culturas puras e mistas de microrganismos, o OE_{tomilho} demonstrou possuir uma atividade antimicrobiana superior, sendo necessárias menores concentrações deste OE para que ocorra inibição do crescimento microbiano. O OE_{erva-príncipe} e nisina, demonstraram também potencial antimicrobiano, no entanto são necessárias concentrações superiores para que haja um efeito eficaz. No que diz respeito à ação sinérgica dos compostos antimicrobianos, esta foi demonstrada apenas para algumas das combinações em análise. Como por exemplo, foi obtido um efeito sinérgico no caso do isolado L2 em três das quatro combinações analisadas e o mesmo efeito tendo em combinação o OE_{tomilho} + Nisina para o isolado E2.
- ✓ Quanto à capacidade de erradicação de biofilme constatou-se que os dois OEs são eficazes quando atuando sobre culturas puras, com uma única exceção: OE_{erva-príncipe} foi incapaz erradicar o biofilme produzido pelo isolado E1. Relativamente à capacidade de erradicação de biofilme de culturas bacterianas mistas, só foi possível determinar CMEBs para quatro das oito combinações, em que o OE_{tomilho} e o OE_{erva-príncipe} demonstram uma eficácia quase nula em sete das combinações testadas. Assim, pode concluir-se que os OEs analisados nestes estudos demonstraram uma fraca capacidade de erradicação de biofilme formado pelas culturas mistas.

No geral, o presente estudo confirmou a potencial aplicabilidade de produtos naturais de origem vegetal/microbiana como agentes antimicrobianos, permitindo o desenvolvimento de novas estratégias de controlo na indústria alimentar.

Como perspetivas futuras, deverão ser realizados mais estudos, de forma a aprofundar o tema em questão. No caso da nisina, poderão ser efetuados novos testes com maior controlo do pH do meio, visto que a solubilidade, estabilidade e atividade biológica da nisina são altamente dependentes desse fator (Moreno *et al.*, 2006). No caso dos OEs devem ser realizados novos estudos para identificação dos seus componentes ativos, visto que existem compostos que, em menor quantidade, podem

apresentar efeitos antimicrobianos relevantes na inibição do crescimento microbiano e erradicação celular, tanto na forma planctónica como sésil. Para além disso, seria interessante estudar a ação dos OEs e da nisina sobre outros microrganismos pertencentes quer ao grupo das Gram-positivas quer ao grupo das Gram-negativas. Seria ainda importante realizar um ensaio-piloto de forma a testar a eficácia dos OEs/bacteriocina em estudo na preservação da qualidade microbiológica (tempo de vida-útil) dos produtos alimentares. É importante salientar a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias de controlo, visto que alguns dos compostos utilizados presentemente têm demonstrado uma baixa eficiência nesta nova vaga de microrganismos patogénicos e deteriorativos multirresistentes que afetam não só a saúde humana, mas também a nível económico.

5. Referências bibliográficas

Abat C., Huart M., Garcia V., Dubourg G., Raoult D. (2016). *Enterococcus faecalis* urinary-tract infections: Do they have a zoonotic origin? *Journal of Infection*, 73(4):305-13.

Abdollahzadeh, E., Rezaei M., Hosseini H. (2014) Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*, 35(1):177–183.

Abdullah S., Badaruddin M., Ali R., Riaz M. N. (2010) Effect of elementary and advanced glycation products of nisin on its preservative efficacy and digestibility. *Food Chemistry*, 122(4):1043–1046.

Aberoum A., Jooyandeh H. (2010) A Review on occurrence and characterization of the *Aeromonas* species from marine fishes. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 2(6):519–523.

Adams M. R., Moss M. O. (2008) *Food Microbiology*. p.158-176; 182-268. 3ª Edição. RSCPublishing, Guildford. UK.

Adinarayana G., Rahul G., Ravi Kiran S., Syamsundar K.V., Rajeswara Rao B.R. (2012) Evaluation of antimicrobial potential of field distilled and water-soluble essential oils of *Cymbopogon flexuosus*. *Journal of Pharmacognosy*, 3(2):142-146.

Adukwu E. C., Allen S. C. H., Phillips C. A. (2012) The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5):1217–1227.

Ahmad A., Van Vuuren S., Viljoen A. (2014) Unravelling the complex antimicrobial interactions of essential oils - the case of *Thymus vulgaris* (Thyme). *Molecules*, 19(3): 2896–2910.

Ahmad A., Viljoen A. (2015) The *in vitro* antimicrobial activity of *Cymbopogon* essential oil (lemon grass) and its interaction with silver ions. *Phytomedicine*, 22(6):657–665.

Ballester-Costa C., Sendra E., Fernández-López J., Pérez-Álvarez J. A., Viuda-Martos M. (2013) Chemical composition and *in vitro* antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth. *Industrial Crops and Products*, 50:304–311.

Bassolé, I. H. N., Juliani, H. R. (2012) Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules*, 17(12):3989–4006.

Benbelaïd F., Khadir A., Abdoune M. A., Bendahou M., Muselli A., Costa J. (2014) Antimicrobial activity of some essential oils against oral multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* in both planktonic and biofilm state. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(6):463–472.

Bhargava, K., Conti, D. S., da Rocha, S. R. P., & Zhang, Y. (2015). Application of an oregano oil nanoemulsion to the control of foodborne bacteria on fresh lettuce. *Food Microbiology*, 47: 69-73.

Boari C. A., Alves M. P., Maximiliano V., Tebaldi R., Savian T. V., Piccoli R. H. (2009) Biofilm formation by *Aeromonas hydrophila* and *Staphylococcus aureus* on stainless steel using milk and different conditions of cultivation. *Food Science and Technology*, 29(4): 886–895.

Burt, S. (2004) Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Food Microbiology*, 94: 233-253.

Ceri H., Olson M.E., Stremick C., Read R.R., Morck D., Buret, A. (1999) The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(6):1771-1776.

Chen H., Davidson P. M., Zhong Q. (2014) Antimicrobial properties of nisin after glycation with lactose, maltodextrin and dextran and the thyme oil emulsions prepared thereof. *International Journal of Food Microbiology*, 191:75–81.

CLSI (2014) Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Craveiro S., Alves-Barroco C., Barreto Crespo M. T., Salvador Barreto A., Semedo-Lemsaddek T. (2015) *Aeromonas* biofilm on stainless steel: Efficiency of commonly used disinfectants. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(4):851–856.

Cunha A. P., Roque O., Nogueira M. (2012) *Plantas Aromáticas e Óleos Essenciais Composição e Aplicações*, Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa. Portugal.

Dalgaard P., Koutsoumanis K. (2001) Comparison of maximum specific growth rates and *lag* times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. *Journal of Microbiological Methods*, 43(3):183–196.

Daskalov, H. (2006) The importance of *Aeromonas hydrophila* in food safety. *Food Control*, 17(6):474–483.

Desai M. A., Parikh J., De A. K. (2014) Modelling and optimization studies on extraction of lemongrass oil from *Cymbopogon flexuosus* (Steud.) Wats. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(5):793–803.

Di Bonaventura G., Piccolomini R., Paludi D., D’Orio V., Vergara A., Conter M., Ianieri A. (2008) Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: Relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*, 104(6):1552–1561.

Dosler S., Gerceker A. A. (2012) *In vitro* activities of antimicrobial cationic peptides; melittin and nisin, alone or in combination with antibiotics against Gram-positive bacteria. *Journal of Chemotherapy*, 24(3): 137–143.

- Faleiro M. L. (2011) The mode of antibacterial action of essential oils. p. 1143-1157. In: Méndez-Vilas A. (eds.). *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Vol. 2, Formatex Research Center, Espanha.
- Fernandes S., Yorika D., Yoshiteru A. (2015) Bifilms of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from the processing of ricotta and the control of these pathogens through cleaning and sanitization procedures. *International Journal of Food Microbiology*, 200:97–103.
- Franz C. M. A. P., Huch M., Abriouel H., Holzapfel W., Gálvez A. (2011) Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 151(2):125–140.
- Gálvez A., Abriouel H., López R. L., Ben Omar N. (2007) Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120(1-2):51–70.
- Gandhi M., Chikindas M. L. (2007) *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113(1):1–15.
- Gavín R., Rabaan A. A., Merino S., Tomás J. M., Gryllos I., Shaw J. G. (2002) Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 43(2):383–397.
- Gharsallaoui A., Oulahal N., Joly C., Degraeve P. (2016) Nisin as a food preservative: Part 1: physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses. *Food Science and Nutrition*, 56(8):1262-1274.
- Giaouris E., Heir E., Hébraud M., Chorianopoulos N., Langsrud, S., Moretro T., Habimana O., Desvaux M., Renier S., Nychas G. (2014) Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Science*, 97(3):289–309.
- Giraffa G. (2002) Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(2):163–171.
- Gribble A., Brightwell G. (2013) Spoilage characteristics of *Brochothrix thermosphacta* and *campestris* in chilled vacuum packaged lamb, and their detection and identification by real time PCR. *Meat Science*, 94(3):361–8.
- Hall B., Acar H., Anna Nandipati. A., Barlow M. (2013) Growth Rates Made Easy. *Molecular Biology and Evolution*, 1(1):232-238.
- Haubert L., Mendonça M., Lopes G. V., Cardoso M. R. de I., Silva W. P. (2015) *Listeria monocytogenes* isolates from food and food environment harboring *tetM* and *ermB* resistance genes. *Letters in Applied Microbiology*, 62(1):23-29.
- He L., Zou L., Yang Q., Xia J., Zhou K., Zhu Y., Han X., Pu B., Hu B., Deng, W. (2016). Antimicrobial activities of nisin, tea polyphenols, and chitosan and their combinations in chilled mutton. *Journal of Food Science*, 81(6):1466-1471.
- Holley R. A. (2014) *Brochothrix*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, p.331–334, 2ª Edição, Elsevier. Canada.

Hood J. R., Wilkinson J. M., Cavanagh H. M. A. (2003) Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. *Journal of Essential Oil Research*, 15(6):428–433.

Hyltdgaard M., Mygind T., Meyer R. L. (2012) Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3:1–24.

Ibrahim H. T., Qiang H., Al-Rekabi W. S., Qiqi Y. (2012) Improvements in biofilm processes for wastewater treatment. *Pakistan Journal of Nutrition*, 11(8):610–636.

Igbinosa I. H., Igumbor E. U., Aghdasi F., Tom M., Okoh A. I. (2012) Emerging *Aeromonas* species infections and their significance in public health. *The Scientific World Journal*, 2012:1–13.

Jafri H., Husain F. M., Ahmad I. (2014) Antibacterial and antibiofilm activity of some essential oils and compounds against clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biomedical and Therapeutic Sciences*, 1(1):65–71.

Jay J.M., Loessner M.J., Golden D.A (2005) *Modern food microbiology*. p.517-671. 7^a Edição. Springer, New York. USA.

Jefferson K. K. (2004) What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, 236(2):163–173.

Kavanaugh N. L., Ribbeck K. (2012) Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11): 4057–4061.

Kerekes E. B., Vidács A., Jenei J. T., Gömöri C., Takó M., Chandrasekaran M. (2015) Essential oils against bacterial biofilm formation and quorum sensing of food-borne pathogens and spoilage microorganisms.p. 429–437. In: Méndez-Vilas A. (eds.). *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*, Vol. 1, Formatex Research Center, Espanha.

Lambert R. J. W., Skandamis P. N., Coote P. J., & Nychas G. J. E. (2001) A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3):453–462.

Lleo M., Bonato B., Tafi M. C., Caburlotto G., Benedetti D., Canepari P. (2007) Adhesion to medical device materials and biofilm formation capability of some species of enterococci in different physiological states, 274:232–237.

Lourenço A., Machado H., Brito L. (2011) Biofilms of *Listeria monocytogenes* produced at 12°C either in pure culture or in co-culture with *Pseudomonas aeruginosa* showed reduced susceptibility to sanitizers. *Journal of Food Science*, 76(2):142–148.

Lu H., Weng X., Li H., Yin Y., Pang M., Tang, Y. (2002) *Enterococcus faecium* -related outbreak with molecular evidence of transmission from pigs to humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(3): 913–917.

Magalhães R., Ferreira V., Brandão T. R. S., Palencia R. C., Almeida G., Teixeira P. (2016) Persistent and non-persistent strains of *Listeria monocytogenes*: A focus on growth kinetics under different

temperature, salt, and pH conditions and their sensitivity to sanitizers. *Food Microbiology*, 57:103–108.

Menoita E., Santos V., Testas C., Gomes C., Santos A. (2012) Biofilms: knowing the entity. *Journal of Aging and Innovation*, 1(2):23-32.

Miladi H., Slama R., Ben Mili D., Zouari S., Bakhrouf A., Ammar E. (2013) Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against foodborne pathogens. *Natural Science*, 5(6):729–739.

Millezi A. F., Cardoso M.G., Alves E., Piccoli R. H. (2013) Reduction of *Aeromonas hydrophyla* biofilm on stainless steel surface by essential oils. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1):73–80.

Mills S., Stanton C., Hill C., Ross R. P. (2011) New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. *Food Science and Technology*, 2:299-329.

Mith H., Duré R., Delcenserie V., Zhiri A., Daube G., Clinquart A. (2014) Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Science and Nutrition*, 2(4):403–16.

Mizan F. R., Jahid I. K., Ha, S. (2015) Microbial biofilms in seafood: A food-hygiene challenge. *Food Microbiology*, 49: 41–55.

Mohsenipour Z., Hassanshahian M. (2015) The inhibitory effect of *Thymus vulgaris* extracts on the planktonic form and biofilm structures of six human pathogenic bacteria. *Journal of Phytomedicine*, 5(4):309–318.

Moore-Neibel K., Gerber C., Patel J., Friedman M., Ravishankar S. (2012) Antimicrobial activity of lemongrass oil against *Salmonella enterica* on organic leafy greens. *Journal of Applied Microbiology*, 112(3):485–492.

Moran U., Phillips R., Milo R. (2010) SnapShot: Key Numbers in Biology. *Cell*, 141(7):1262.

Moreno M. R. F., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., Vuyst L. (2006) The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106:1–24.

Nazzaro F., Fratianni F., Martino L., Coppola R., De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12):1451–1474.

Nostro A., Roccaro A. S., Bisignano G., Marino A., Cannatelli M. A., Pizzimenti F. C., Cioni P.L., Procopi F., Blanco A. R. (2007) Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Medical Microbiology*, 56(4):519–523.

Novais, M.R. (2006) Boas práticas e pré-requisitos HACCP. *Segurança e Qualidade Alimentar*, 2: 10-11.

Nowak A., Kalembe D., Krala L., Piotrowska M., Czyzowska A. (2012) The effects of thyme (*Thymus vulgaris*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils on *Brochothrix thermosphacta* and on

the shelf life of beef packaged in high-oxygen modified atmosphere. *Food Microbiology*, 32(1):212–216.

Nowak A., Rygala A., Oltuszek-Walczak E., Walczak P. (2011) The prevalence and some metabolic traits of *Brochothrix thermosphacta* in meat and meat products packaged in different ways. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(6):1304–1310.

Nyarko E. B., Donnelly C. W. (2015) *Listeria monocytogenes* : strain heterogeneity, methods, and challenges of subtyping. *Journal of Food Science*, 80(12):2868-2878.

O'Toole G., Kaplan H. B., Kolter R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54:49–79.

Ogier J. C., Serror P. (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: *The Enterococcus genus*. *International Journal of Food Microbiology*, 126(3):291–301.

Olasupo N. A., Fitzgerald D. J., Gasson M. J., Narbad A. (2003) Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Letters in Applied Microbiology*, 37(6):448–451.

Olasupo N. A., Fitzgerald D. J., Narbad A., Gasson M. J. (2003) Inhibition of *Bacillus subtilis* and *Listeria innocua* by nisin in combination with some naturally occurring organic compounds. *Journal of Food Protection*, 67(3):596–600.

Oliveira M. M. M., Brugnera D. F., Do Nascimento J. A., Piccoli R. H. (2012) Control of planktonic and sessile bacterial cells by essential oils. *Food and Bioprocess Processing*, 90(4):809–818.

Oliveira M.M.M., Brugnera D.F., Cardoso M.G., Alves E., Piccoli R.H. (2010) Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control*, 21(4):549–553.

Oliveira M.M.M., Brugnera D.F., Piccoli R.H. (2010) Microbial biofilms in the food industry: a review, *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 69(3):277–284.

Olson M. E., Ceri H., Morck D. W., Buret A. G., Read R. R. (2002) Biofilm bacteria: Formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 66(2):86–92.

Ortega-Ramirez L., Silva-Espinoza B., Vargas-Arispuro I., Gonzalez-Aguilar G., Cruz-Valenzuela R., Nazzaro F., Ayala-Zavala F. (2016) Combination of *Cymbopogon citratus* with *Allium cepa* essential oils increased antibacterial activity in leafy vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, doi: 10.1002/jsfa.8025.

Pablos M., Huys G., Cnockaert M., Rodríguez-Calleja J. M., Otero A., Santos J. A., García-López M. L. (2011) Identification and epidemiological relationships of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea, drinking water and foods. *International Journal of Food Microbiology*, 147(3):203–210.

Padalia H., Moteriya P., Baravalia Y., Chanda S. (2015) *Antimicrobial and synergistic effects of some essential oils to fight against microbial pathogens-a review*. p. 34–45. In: Méndez-Vilas A. (eds.). *The*

Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs, Vol. 1, Formatex Research Center, Espanha.

Perini S., Piccoli R. H., Nunes C. A., Bruhn F. R. P., Custódio D.A.C ,Costa, G. M. (2014) Antimicrobial activity of essential oils against pathogens isolated from Bovine Mastitis. *Journal of Natural Product and Plant Resources*, 4(2):6–15.

Pinto J., Neves R. (2010) *HACCP: Análise de riscos no processamento alimentar*. p. 20-50. 2ª edição, Publindústria. São Paulo.

Poimenidou V., Chrysadaku M., Tzakoniati A., Bikouli V. C., Nychas G., Skandamis P. N. (2016) Variability of *Listeria monocytogenes* strains in biofilm formation on stainless steel and polystyrene materials and resistance to peracetic acid and quaternary ammonium compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 237:164–171.

Prabuseenivasan S., Jayakumar M., Ignacimuthu S. (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6:39.

Prieto A. M. G., Schaik W., Rogers M. R. C., Coque T. M., Baquero F., Corander J., Willems R. J. L. (2016) Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens : attack of the clones? *Frontiers in Microbiology*, 7(788):1-15.

Quendera A. (2014) *Antimicrobial activity of essential oils against multiresistant aeromonads and enterococci* Dissertação de Mestrado em Microbiologia Aplicada. Faculdade de Ciências - Universidade de Lisboa, Lisboa.

Ramu R., Shirahatti P. S., Devi A. T., Prasad A., Kumuda J., Louchana M.S., Zemeer F., Dhananjaya B.L., Nagendra Prasad M.N. (2015) Bacteriocins and their applications in food preservation. *Food Science and Nutrition*, 1549-7852.

Rattanasomboon N., Bellara S. R., Harding C. L., Fryer P. J., Thomas C. R., Al-Rubeai M., McFarlane C. M. (1999) Growth and enumeration of the meat spoilage bacterium *Brochothrix thermosphacta*. *International Journal of Food Microbiology*, 51(2-3):145–58.

Rodrigues L. B., Santos L. R. Rizzo N. N., Tagliari V. Z., Oliveira A. P. Trenhago G., Rodegheri S.C., Taglieti R.M., Dickel E.L., Nascimento V. (2009) Hydrophobicity and biofilm formation on polystyrene by *Salmonella* Heidelberg isolated from a poultry slaughterhouse. *Acta Scientiae Veterinariae*, 37(3):225–230.

Santos, I., Cunha, I. (2007) Patogénicos emergentes em alimentos. *Segurança e Qualidade Alimentar*, 2:10-13.

Semedo T., Santos M. A., Lopes M. F. S., Figueiredo Marques J. J., Barreto Crespo M. T., Tenreiro R. (2003) Virulence factors in food, clinical and reference enterococci: A common trait in the genus? *Systematic and Applied Microbiology*, 26:13–22.

Semwal R. B., Semwal D. K., Mishra S. P., Semwal R. (2015) Chemical composition and antibacterial potential of essential oils from *Artemisia capillaris* , *Artemisia nilagirica* , *Citrus limon* , *Cymbopogon flexuosus* , *Hedychium spicatum* and *Ocimum tenuiflorum*. *The Natural Products Journal*, 5:199–205.

- Seow Y. X., Yeo C. R., Chung H. L., Yuk H.-G. (2014) Plant essential oils as active antimicrobial agents. *Food Science and Nutrition*, 54(5):625–44.
- Settanni L., Corsetti A. (2008) Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 121(2):123–138.
- Shi X., Zhu X. (2009) Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science and Technology*, 20(9):407–413.
- Simões M., Simões L. C., Vieira M. J. (2010) A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43(4):573–583.
- Singh N., Singh R. K., Bhunia A. K., Stroshine, R. L. (2002) Efficacy of chlorine dioxide, ozone , and thyme essential oil or a sequential washing in killing *Escherichia coli* O157 : H7 on lettuce and baby Carrots. *LWT - Food Science and Technology*, 35(8):720–729.
- Soares E. (2007) Doenças de origem alimentar: Infecções e Intoxicações. *Segurança e Qualidade Alimentar*, 2:6-8.
- Srey S., Jahid I. K., Sang-Do H. (2013) Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31(2):572–585.
- Starliper C. E., Ketola H. G., Noyes A. D., Schill W. B., Henson, F. G., Chalupnicki, M. A., Dittman D. E. (2015) An investigation of the bactericidal activity of selected essential oils to *Aeromonas* spp. *Journal of Advanced Research*, 6(1):89–97.
- Stoodley P., Sauer K., Davies D. G., Costerton J. W. (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 56:187–209.
- Tavares A. B., Cereser N. D., Timm C. D. (2014) Occurrence of *Aeromonas* spp. in foods of animal origin and its importance in public health., *Food Safety*, 55(5):1–8.
- Van Houdt R., Michiels C. W. (2010) Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*, 109(4):1117–1131.
- Vázquez-Boland J. A, Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domi G., González-Zorn B., Wehland J. (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3):584–640.
- Viegas S. (2014) *Segurança Alimentar - Guia de Boas Práticas do Consumidor*. p. 5-7. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Lisboa, Portugal.
- Yang E., Fan L., Jiang Y., Doucette C., Fillmore S. (2012) Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. *AMB Express*, 2(1):48.
- Yang S.C., Lin C.-H., Sung C. T., Fang J.-Y. (2014) Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology*, 5:1–10.

Zhang Q., Shi G.-Q., Tang G.-P., Zou Z.-T., Yao G.-H., Zeng G. (2012) A foodborne outbreak of *Aeromonas hydrophila* in a college, Xingyi City, Guizhou, China, 2012. *Western Pacific Surveillance and Response Journal : WPSAR*, 3(4):39–43.

Zhou H., Fang J., Tian Y., Lu X. Y. (2013) Mechanisms of nisin resistance in Gram-positive bacteria. *Annals of Microbiology*, 64(2):413–420.